



Université du Québec à Rimouski - Institut des Sciences de la mer de Rimouski

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue le 21 mars 2013, à l'Université du Havre (France)

Par Marion TANGUY

Pour obtenir le grade de

Ph.D de l'Université du Québec à Rimouski

du programme de Doctorat conjoint en Océanographie

préparée dans le cadre d'une cotutelle internationale de thèse entre l'Université du Québec à Rimouski - Institut des sciences de la mer et l'Université du Havre

**Réponses physiologiques et variations du transcriptome
hémocytaire de *Mytilus edulis* lors d'une infection par
*Vibrio splendidus***

Directeur de thèse : Jean-Michel DANGER
Co-directeur de thèse : Jocelyne PELLERIN

Jury

- Wilfried SANCHEZ, Docteur - Ingénieur de recherche (HDR), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Verneuil-en-Halatte (France) (*Président du Jury*)
- Alain GEFFARD, Professeur des Universités - Laboratoire Interactions Animal-Environnement, Université de Reims Champagne-Ardenne (France) (*Membre externe*)
- Ahmed SIAH, Docteur, Département de Pathologie et de Microbiologie de l'Île du Prince Édouard, Professeur associé à l'Université du Québec à Rimouski (Canada)
- Jocelyne PELLERIN, Professeur Chercheur, Institut des sciences de la Mer de Rimouski (Québec, Canada)
- Jean-Michel DANGER, Professeur des Universités, Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques, Université du Havre (France)

Résumé : Les moules marines *Mytilus edulis* combinent un rôle important en écologie comme espèce sentinelle pour des programmes de surveillance environnementale et une importance économique du fait de leur consommation et de l'activité aquacole développée chez cette espèce dans plusieurs régions du monde. Les événements de mortalité causés par des bactéries pathogènes et des parasites n'ont pas été observés chez les moules, suggérant qu'elles possèdent un système immunitaire inné relativement efficace pour lutter contre les microorganismes. Afin de rechercher et d'expliquer les principes physiologiques et moléculaires fondamentaux qui régulent leurs mécanismes de défenses, un modèle *in vitro* d'interaction des hémocytes de *M. edulis* – *V. splendidus*, bactéries pathogènes de plusieurs espèces de bivalves, a été mis en place en exposant les bactéries pendant 0 (contrôle), 2, 4 et 6 heures.

Des réponses physiologiques (non-adhérence des hémocytes, activités phagocytaires et activation du stress oxydant) ont été observées dès 2 heures d'exposition à la souche *V. splendidus* LGP32. Cette souche semble avoir la capacité à moduler le système immunitaire des moules. Le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposé à *V. splendidus* LGP32 a été déterminé grâce à des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (pyroséquençage 454 et *Illumina*) et étudié. Des analyses d'expression différentielle (*RNA-Seq* et technologie d'ADN branché) ont permis d'identifier des acteurs moléculaires clés de la réponse immunitaire. Des transcrits codant des protéines impliquées dans les voies des récepteurs Toll et des facteurs de transcription, l'adhésion des cellules, la phagocytose, le stress oxydant, l'apoptose et l'autophagie ainsi que des transcrits relatifs à des cytokines, des inhibiteurs de protéases et des protéines de stress ont été identifiés. Certains d'entre eux sont régulés lors de l'exposition bactérienne.

Mots clés : *Mytilus edulis*, hémocytes, *Vibrio splendidus*, réponses hôtes, transcriptome, expression de gènes, pyroséquençage 454, *RNA seq*.

Abstract: Marine mussels, *Mytilus edulis* combine a key role as a sentinel species for environmental monitoring programs and a significant economic importance because of the aquaculture production in many areas of the world. Mortality events caused by pathogens and parasites infections have never been reported in mussels, suggesting an efficient immune system to defend itself against microorganisms. In order to investigate and to explain physiological and molecular fundamental principles that rules defenses mechanisms, an *in vitro* model of interaction of *M. edulis* hemocytes-*V. splendidus*, pathogenic bacteria in several bivalves species, was created by exposing bacteria during 0 (control), 2, 4 and 6 hours.

Physiological responses (hemocyte adhesion, phagocytosis abilities, and oxidative burst activation) were observed after 2 hours of exposure to *V. splendidus* LGP32. This strain seems to have the ability to modulate the mussel immune system. Transcriptome of *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 was determined with next generation sequencing technologies (454 pyrosequencing and *Illumina*) and studied. Key molecular actors of immune response were identified by differential expression analysis (*RNA-Seq* and branched DNA technology). Transcripts encoded for proteins involved in Toll-like receptors and transcription factors pathways, cells adhesion, phagocytosis, oxidative burst, apoptosis and autophagy as well as transcripts related to some cytokines, proteases inhibitors and stress protein were identified. Some of them were regulated during bacterial exposure.

Key words: *Mytilus edulis*, hemocytes, *Vibrio splendidus*, host responses, transcriptome, genes expression, 454 pyrosequencing, *RNA seq*.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie Alain Geffard et Wilfried Sanchez qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à Frank Le Foll, membre externe du comité de thèse Québécois, pour avoir participé à mes séminaires et pour les conseils que tu m'as apportés.

Je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) du Canada ainsi que l'Institut des Sciences de la Mer de Rimouski pour le financement de ce travail. Merci aussi à Christophe Minier, Directeur du Laboratoire d'Ecotoxicologie-Milieux Aquatiques (LEMA) pour m'avoir apporté le financement afin de finaliser sereinement cette thèse.

Merci à Sophie Gauthier-Clerc, coordinatrice du programme de recherche financé par le CRSNG. Tu m'as aidé pour les démarches entre la France et le Québec ainsi que pour mon inscription à l'UQAR.

Je remercie le "Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College" de l'Université de l'Île du Prince Édouard pour m'avoir ouvert les portes afin de réaliser mes travaux de laboratoire.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mes encadrants de thèse.

A Jocelyne Pellerin. Merci Jocelyne d'avoir acceptée de prendre la co-tutelle de cette thèse, merci pour votre soutien dans la réalisation de ce projet.

A Jean-Michel Danger, mon directeur de thèse. Jean-Michel merci pour tout ! Merci pour les nombreuses heures passées sur skype lors de mon séjour canadien, pendant mon examen en océanographie à l'UQAR et pendant mes 2 ans à PEI. Merci pour ton implication, tes précieux conseils tout au long de la thèse qui ont toujours été riches et pertinents et ta façon de voir les choses. Je te remercie pour tes conseils en informatique et pour la grande aide que tu m'as apportée dans l'analyse de toutes ces séquences. J'ai beaucoup appris grâce à toi !

A Ahmed Siah, encadrant de la thèse. Ahmed, j'ai appris avec toi toutes les bases en laboratoire de la biologie moléculaire. Tu as toujours été présent et à l'écoute, tu m'as guidé dans l'ensemble de mon travail et tu as pris le temps de répondre à mes questions et de me donner de précieux conseils. Ta disponibilité et ton enthousiasme ont été pour moi de réels moteurs pour réaliser pleinement ce travail. Tu m'as également guidé avec l'anglais et forcé à faire des présentations, à m'exprimer dans cette langue. Pour tout cela, je te remercie énormément. C'est une chance pour moi de t'avoir eu comme encadrant, ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés et de passer du bon temps avec toi et ta famille !

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein du laboratoire « d'Ahmed » à l'Université de l'île du Prince Edouard et je remercie l'ensemble de la petite équipe. Tout particulièrement, un grand merci à Patty McKenna, technicienne. Patty, thanks a lot for your technical help with my works. Thanks for your advices and your knowledge and for your patience with my English during our conversations. Merci aussi à Julie, tu m'as bien aidée lors de mon arrivée à PEI.

Je remercie également Karine pour la relecture des écrits en anglais et pour ton amitié, tes conseils sur la vie sur l'île et les moments qu'on a passé ensemble à PEI.

De même, je remercie les membres du LEMA avec qui j'ai partagé des moments de détente lors de la dernière partie de ma thèse.

Un grand merci aussi à tous mes amis avec qui je passe des moments inoubliables et une attention particulière à la JT !

Je remercie également toute ma famille pour leur soutien: Papa, Maman, Guy, Anne-Marie, Julien, Antoine, Eric et Nico (allias JP la menace) ainsi que mes oncles, mes tantes, mes grands-parents. Pour certains d'entre vous, merci d'avoir parcouru des milliers de kilomètres pour venir nous voir ! Tout particulièrement, je tiens à remercier mes parents Serge et Nelly, et Guy et Anne-Marie sans qui je ne serais jamais arrivé là. Vous m'avez toujours fait confiance, vous m'avez confortée dans tous mes choix, merci de m'avoir soutenu dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils et de vos attentions constantes.

Enfin, un énorme merci à celui qui est dans mon cœur, Sylvain. Tu as toujours été présent, tu m'as suivi à l'autre bout du monde et ton soutien au quotidien, tes encouragements et tes attentions ont largement contribué à la réalisation de ce travail. Je ne t'exprimerais jamais assez toute ma reconnaissance et je te dédie cette thèse.

Merci à tous

Sommaire

Remerciements

Sommaire

Introduction générale.....7

Chapitre I : Synthèse bibliographique et état de l’art.....11

I.1 Modèles biologiques.....12

A- *Mytilus edulis*.....12

A.1 Biologie et habitat de la moule bleue.....12

A.2 Intérêt commercial de la moule bleue.....18

B- Les vibrios.....20

B.1 *Vibrio splendidus*.....22

B.2 *Vibrio splendidus* souche LGP32.....23

I.2 Immunité innée chez les bivalves.....25

A-Immunité innée et immunité adaptative.....25

B-La défense cellulaire : les hémocytes.....27

B.1 Les types d’hémocytes.....27

B.2 Ontogénèse.....30

B.3 Rôle des hémocytes lors d’une inflammation.....31

C-Les défenses humorales.....	32
C.1 Les lectines.....	32
C.2 Le système du complément C1q.....	34
C.3 Les peptides antimicrobiens.....	35
C.4 Les enzymes hydrolytiques.....	39
C.5 Les protéines de chocs thermiques (HSPs)	41
C.6 Le système prophénoloxydase.....	42
C.7 Les produits oxydatifs.....	44
C.8 Les inhibiteurs de protéases.....	46
C.9 Les cytokines.....	48
D- Interactions Bivalves-Bactéries.....	49
D.1 Les mécanismes de défense des bivalves lors d'une infection bactérienne.....	50
D.2 Les effets des bactéries sur les hémocytes	55
D.3 Les mécanismes par lesquels les bactéries causent leurs effets : les facteurs bactériens de virulence.....	58
E- Bilan de l'état des connaissances.....	59
 I.3 Émergence des technologies: la transcriptomique fonctionnelle.....	60
A-Concept.....	61
B-Méthodes d'étude du transcriptome.....	62
B.1 Systèmes « ouverts »	62
B.2 Systèmes « fermés » : le nombre de gènes à analyser est fixé au départ.....	64
C-Nouvelle génération de séquençage (NGS).....	69
C.1 Le pyroséquençage haut débit (454)	70

C.2 Le séquençage Illumina.....	74
C.3 Le séquençage SOLiD.....	76
C.4 Comparaison de ces techniques.....	77
C.5 Applications de ces technologies de nouvelle génération de séquençage pour l'étude du transcriptome.....	79
D-Étude du transcriptome chez les bivalves.....	83
I.4 Objectifs du travail de thèse.....	87
A-Contexte de l'étude.....	87
B-Objectifs spécifiques.....	88

Chapitre II : Détermination du transcriptome des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à *Vibrio splendidus*.....91

II.1 Note.....	92
A- <i>Mytilus edulis</i> ou <i>Mytilus trossulus</i> ?.....	92
B- Souche de <i>V. splendidus</i> LGP32 pathogène pour <i>M. edulis</i> ?.....	94
B.1 Infection bactérienne.....	94
B.2 PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).....	95
C- Conclusion.....	96

II.2 Pyroséquençage de la banque d'ADNc normalisée des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à *Vibrio splendidus* LGP32.....97

Publication 1

Chapitre III : Réponses fonctionnelles et moléculaires des hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> exposés à trois souches de <i>Vibrio splendidus</i>	111
--	------------

Publication 2

Chapitre IV : Les acteurs moléculaires impliqués dans les réponses immunitaires des hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> exposés à <i>Vibrio splendidus</i> LGP32	123
--	------------

Publication 3

Chapitre V : Discussion générale et Conclusion	185
V.1 Synthèse du cheminement et des résultats	186
V.2 Discussion générale et perspectives	189
A-Les changements physiologiques lors de l'exposition des hémocytes de <i>M. edulis</i> exposés à <i>V. splendidus</i> LGP32	190
<i>Réponses morphologiques : capacité d'adhérence des hémocytes</i>	190
<i>Réponses fonctionnelles : phagocytose et stress oxydant</i>	192

B-Les acteurs moléculaires impliqués dans réponses immunitaires des hémocytes de <i>M. edulis</i> exposés à <i>V. splendidus</i> LGP32.....	195
<i>Les récepteurs de reconnaissance du patron (PRRs)</i>	196
<i>Les voies de signalisation cellulaire</i>	200
<i>Les cytokines et la voie des JAK/STAT</i>	202
<i>Les inhibiteurs de protéases et les protéines de stress</i>	203
<i>Adhésion des cellules et communication</i>	205
<i>La phagocytose et les molécules impliquées</i>	206
<i>Le stress oxydant</i>	208
<i>La mort cellulaire programmée</i>	209
C-Différences de pathogénicité entre les souches de <i>V. splendidus</i> LGP32 et 7SHRW.....	210
V.3 Conclusion et perspectives globales	213
Références Bibliographiques.....	215

Introduction générale

Avec plus de 140 000 espèces, le phylum des mollusques, parmi le plus primitif des métazoaires, est le deuxième en importance après celui des arthropodes. Plus de 50 000 espèces de mollusques marins ont été décrites à ce jour (Kornprobst, 2005). Ils possèdent une organisation structurale simple leur permettant cependant d'endurer des conditions écophysiologiques qui peuvent être extrêmement difficiles. A titre d'exemple, les bathymodiales (Bivalves, Mytilidae) qui vivent dans les profondeurs abyssales près des fumeurs océaniques, possèdent des mécanismes adaptatifs étonnants (Boutet *et al.*, 2009). Notamment, ils vivent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques intracellulaires, localisées à l'intérieur de cellules spécialisées de l'épithélium branchial nommées bactériocytes (Duperron, 2005). De plus, les mollusques lamellibranches constituent d'excellents bio-indicateurs de contamination des eaux marines et continentales grâce à leurs fortes capacités de bio-accumulation. De fait, les moules et les myes, notamment, ont été employées à vaste échelle dans la bio-surveillance des écosystèmes aquatiques en milieu marin. Aujourd'hui, la moule est reconnue comme organisme sentinelle dans de nombreuses études sur la qualité de l'environnement au Canada (Akaishi *et al.*, 2007 ; Pellerin *et al.*, 2009, Gagné *et al.*, 2009), aux États-Unis (Wade *et al.*, 1998) ou en Europe (Auffret *et al.*, 2006). Ainsi, ces organismes marins présentent un intérêt scientifique important, en biologie mais également en écotoxicologie. En outre, nombre de bivalves (huîtres, moules, pétoncles, myes, coquilles Saint-Jacques, palourdes) présentent un intérêt économique du fait de leur consommation et de l'activité aquacole développée pour certaines espèces. Ainsi, en 2009, la production conchylicole correspondait à 19 % de la production mondiale d'aquaculture, avec 13,5 millions de tonnes d'une valeur de 13 milliards de dollars. Les Mytilidés représentent environ 13 % des mollusques cultivés dans le monde (FAO, 2011). Au Canada et en Europe, la moule est maintenant une des principales espèces aquacoles et a donc une importance économique considérable. A titre d'exemple, la mytiliculture sur l'Île du Prince Édouard représente 80% de la production totale de

moules en Amérique du nord. La pérennité de cette industrie est cruciale pour le secteur économique des Iles et des régions côtières.

Cependant, l'industrie aquacole connaît des difficultés. Des phénomènes de mortalité estivale sont régulièrement décrits chez de nombreuses espèces. Ces mortalités peuvent être attribuées à des conditions environnementales défavorables résultant d'activités anthropiques et/ou des changements des conditions environnementales naturelles. Par exemple, des températures de l'eau plus élevées que la normale, des niveaux de salinité variables, de faibles teneurs en oxygène dissous, des pollutions chimiques et la présence de microorganismes nuisibles, y compris des bactéries et des algues toxiques, comptent parmi ces conditions de stress capables d'altérer les défenses immunitaires des mollusques. Plus particulièrement, la présence de pathogènes a souvent été observée dans des cas de mortalités estivales (Cheney *et al.*, 2000; Gestal *et al.*, 2008; Huvet *et al.*, 2004). Parmi les bactéries opportunistes, les bactéries Gram-négative du genre *Vibrio* sont les plus souvent isolées à partir des mollusques. Notamment, en France, *Vibrio splendidus* a été associé avec les mortalités de juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* (Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a, b).

Pendant la dernière décennie, différentes études ont déterminé les mécanismes par lesquels les mollusques interagissent avec les microorganismes pathogènes (Lane et Birkbeck, 2000; Canesi *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005; Allam *et al.*, 2006). Pour lutter contre les micro-organismes, les mollusques sont capables de réactions puissantes, non-spécifiques et dépourvues de mémoire, regroupées sous le terme d'immunité innée, impliquant aussi bien des processus cellulaires qu'humoraux. En effet, les défenses innées reposent sur un ensemble de mécanismes complexes faisant intervenir des molécules de reconnaissance du « non-soi », des voies de signalisation cellulaire, et l'activation de cellules immunocompétentes, les hémocytes. Ces cellules sont impliquées dans différents processus dont la phagocytose qui s'accompagne d'une production importante de divers radicaux oxygénés et d'enzymes ayant une activité cytotoxique. Par ailleurs, elles sont également impliquées dans la production d'un grand nombre de peptides et protéines à activités antimicrobiennes.

Le projet s'inscrit dans un programme du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) visant à mieux comprendre et caractériser les différents mécanismes du fonctionnement du système immunitaire des bivalves en réponse à des agressions extérieures. Plus particulièrement, ce travail de thèse vise à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la réponse immunitaire des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés aux bactéries Gram-négatives *Vibrio splendidus*. Plus spécifiquement, des changements physiologiques se produisant lorsque les hémocytes sont exposés aux bactéries seront étudiés et liés aux résultats d'une approche transcriptomique.

Ce document se structure en cinq chapitres. Le chapitre I est une synthèse bibliographique de l'immunité innée des bivalves et des nouvelles technologies pour les études du transcriptome afin de placer dans leur contexte et d'expliquer les objectifs du travail de thèse. Ainsi, les objectifs généraux et spécifiques sont décrits à la fin de cette partie. Ce chapitre présente également les espèces choisies pour ce travail, *Mytilus edulis* et *Vibrio splendidus*. Les chapitres II, III et IV, structurés sous forme de publications, traitent des méthodes utilisées et des résultats obtenus afin de répondre aux objectifs. Enfin, le chapitre V est une discussion des principaux résultats obtenus au cours de ce travail, suivie d'une conclusion ouvrant un certain nombre de perspectives à ce travail.

Chapitre I

Synthèse bibliographique et état de l'art

Le premier chapitre de ce travail est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles relatives à l'immunité innée des bivalves ainsi que des technologies pour l'analyse du transcriptome.

La première partie (I.1) présente les modèles biologiques choisis pour cette étude, à savoir *Mytilus edulis* et *Vibrio splendidus*.

La deuxième partie (I.2) est un état de l'art concernant l'immunité innée chez les bivalves.

Dans la troisième partie (I.3), les différentes technologies ayant émergé pour l'étude du transcriptome sont présentées.

Enfin, la dernière partie (I.4) expose les objectifs de ce travail de thèse.

I.1 Modèles biologiques

A- *Mytilus edulis*

La moule bleue (*Mytilus edulis*, Linné) est un mollusque bivalve très répandu, appartenant à la sous-classe des ptériomorphes, à l'ordre des mytiloïdes et à la famille des mytilidés.

A.1 Biologie et habitat de la moule bleue

- Anatomie

La moule bleue possède un corps mou protégé par une coquille calcaire, composée de deux valves symétriques reliées par une charnière, dont l'ouverture est régulée par les muscles adducteurs antérieur et postérieur (*Figure 1*). Les reflets bleutés ornant sa coquille ont conditionné cette dénomination commune de moule bleue. Le corps mou est formé de deux lames palléales englobant la totalité du corps. Il est constitué du céphalopodium (ensemble de la tête et du pied) et d'une masse viscérale dont l'enveloppe protectrice s'appelle le « manteau ». Le manteau fait à la fois office de gonade, d'organe de réserve énergétique, et assure la synthèse de la coquille. Par ailleurs, il définit les contours de la cavité palléale dans laquelle baignent les branchies en forme de lamelles et se trouve un organe musculeux appelé le pied (*Figure 1*). Les moules sont considérées comme acéphales, il n'y a donc pas de différenciation de la tête mais un regroupement d'organes sensoriels avec seulement une bouche entourée de palpes labiaux qui facilitent l'ingestion des particules alimentaires.

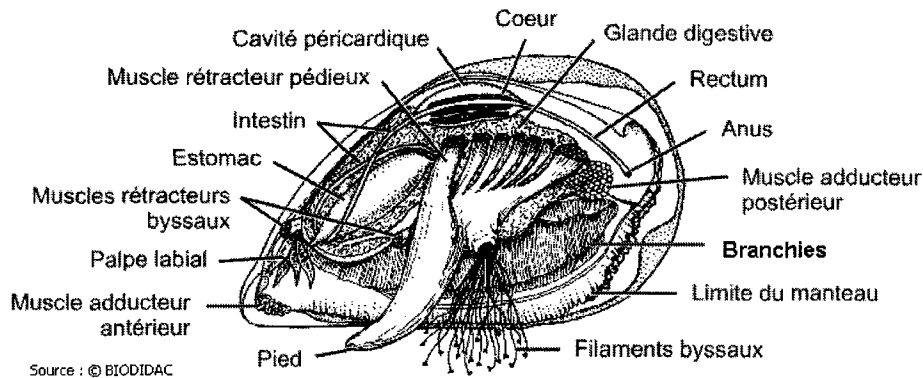


Figure 1 : Principaux éléments anatomiques internes d'une moule (Source : Biodidac)

Mytilus edulis est un organisme filtreur microphage qui se nourrit en retenant les éléments en suspension dans l'eau. La moule filtre l'eau de mer à travers ses branchies et récupère les particules alimentaires qui y sont retenues. Ces animaux peuvent filtrer et ingérer une grande variété de particules en suspension, majoritairement du phytoplancton, des bactéries et du microzooplancton (Bayne et Newell, 1983).

De plus, comme tous les bivalves, la moule bleue possède un système circulatoire ouvert, le système hémolympatique qui comprend un cœur composé d'un ventricule et de deux oreillettes. La circulation s'effectue à partir du ventricule qui propulse l'hémolymphe dans les aortes antérieures et postérieures, puis dans les artères et enfin dans les artérioles. Ainsi, l'hémolymphe, pompée par le cœur, se déverse dans un espace liquide ouvert, l'hémocœle et baigne, par conséquent, directement dans les tissus. Le cœur, qualifié de diffus, est constitué de ramification de lacunes ou sinus à parois fines qui permettent le retour de l'hémolymphe vers ce dernier (Eckert *et al.*, 1999). De ce fait, l'hémolymphe assure à la fois un rôle analogue à celui du sang et du liquide cœlomique chez les vertébrés. Il véhicule notamment plusieurs types cellulaires, les hémocytes, qui ont un rôle important dans le système immunitaire des moules, assurant entre

autres la phagocytose (Eckert *et al.*, 1999). Aussi, les hémocytes permettent le transport des déchets vers les régions du corps où ils pourront être évacués. Le système excréteur de la moule bleue est constitué par les organes de Bojanus, dont la fonction est comparable à celle des reins chez les vertébrés. Ces organes s'apparentent à deux tubes recourbés en U qui communiquent d'une part avec la cavité péricardique, et d'autre part avec la cavité palléale où sont rejetés les déchets (Eckert *et al.*, 1999).

- Reproduction et cycle larvaire

Les moules sont des animaux dioïques, ce qui signifie que les sexes sont séparés. A la ponte, elles expulsent leurs gamètes dans l'eau où se déroule la fécondation (*Figure 2*). En Atlantique, la ponte se produit de la mi-mai à la fin septembre et peut être déclenchée par des facteurs tels que des variations dans la quantité de nourriture présente dans l'eau, des changements brutaux de la température de l'eau ou un dérangement physique (Lubet, 1980). Une amine biogène, la sérotonine stimule le largage des gamètes. La dopamine semble également jouer un rôle important dans la reproduction (Osada *et al.*, 1987). Fait rare dans le vivant, une double transmission uniparentale des mitochondries a été mise en évidence chez les moules. Ainsi, dans le manteau, subsistent à la fois des mitochondries provenant du mâle et de la femelle (Breton *et al.*, 2007). Cette caractéristique, presque unique, peut être mise à profit pour déterminer le sexe des individus en dehors de la période de gamétogénèse (Venier *et al.*, 2003). En effet, les espèces possédant ce système atypique sont caractérisées par la présence, chez le mâle exclusivement, de deux ADN mitochondriaux (ADNmt) distincts qui sont hérités de façon maternelle (ADNmt F) ou paternelle (ADNmt M). Ainsi, les femelles sont homoplasmiques et contiennent uniquement l'ADNmt F (maternel) tandis que les mâles sont hétéroplasmiques. Chez ces derniers, l'ADNmt F domine dans les tissus somatiques alors que la gonade contient presque exclusivement l'ADNmt M (Breton *et al.*, 2007).

En très peu de temps après la fécondation (environ 5 heures), les embryons deviennent des larves qui nagent librement et se nourrissent de petites cellules de phytoplancton. Puis, après différents stades de croissance, le dernier stade larvaire, celui des larves véligères, est atteint. Les larves

peuvent alors se fixer définitivement à un substrat solide pour se développer en moules juvéniles (Figure 2). Les individus sont généralement matures au bout d'un an et leur espérance de vie maximale avoisine les 10 ans (Newell, 1989). Leur longueur est comprise entre 5 et 12 cm, la taille de 2 cm étant atteinte de manière générale dès l'année suivant sa fixation sur le substrat.

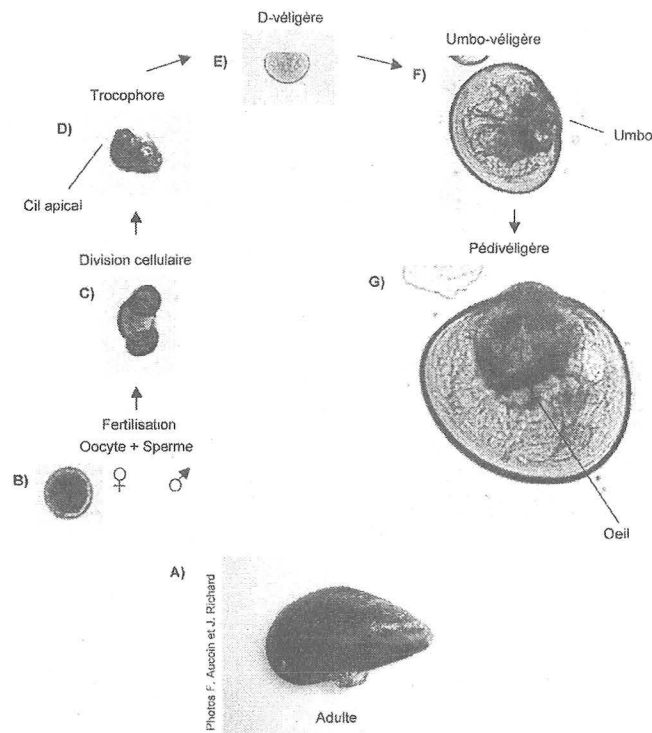


Figure 2: Cycle de reproduction de la moule bleue *Mytilus edulis*. A la ponte, les moules adultes (A) expulsent leurs gamètes dans l'eau où se déroule la fécondation. Rapidement, les oocytes sont fertilisés par le sperme des mâles de la même espèce (B). Après la fécondation, la cellule œuf se divise (C). Ces divisions cellulaires résultent en une larve mobile appelée « trocophore » (D) qui, grâce au cil apical, se déplace en tournant sur elle-même. Après un à trois jours de vie, la larve prend la forme d'un « D » et le cil apical disparaît, c'est le stade D-véligère (E). La larve se déplace dans l'eau à l'aide de son vélum, un organe locomoteur muni de cils vibratiles. Puis la larve se transforme en Umbo-véligère (F) ; l'umbo est la zone de la coquille située près de la charnière, au plus fort de la courbure. Ensuite, l'apparition du pied et d'un point noir appelé oeil est caractéristique du stade pédivéligère (G) ; la larve est alors prête à se fixer (Source : Aucoin *et al.*, 2003).

Les moules sont des organismes « sessiles ». Elles s'attachent sur divers substrats immergés comme les rochers, les parties immergées des bouées, pilotis et mouillages ainsi que sur les coques des bateaux. De plus, la moule, animal grégaire, se fixe à d'autres moules, formant ainsi des agrégats denses pour mieux se protéger contre les vagues qui pourraient la déloger de son substrat. La fixation au substrat est assurée par leur byssus qui est constitué de filaments adhésifs protéiques sécrétés par la glande byssale. Cette sédentarité contribue à en faire des animaux de choix en biosurveillance de la qualité environnementale car, durant toute leur vie adulte, ils seront soumis aux mêmes stress naturels ou anthropiques chroniques.

- Répartition géographique et habitat

Mytilus edulis présente une large répartition géographique. En effet, le spectre d'habitat de ce mollusque s'étend de la côte est de l'Amérique du Nord (USA et Canada), vers le sud du Groenland et de l'Islande puis, jusqu'aux côtes ouest de l'Europe (Pêches et Océan Canada, 2003). En Europe, la moule bleue peuple aussi bien les zones nordiques de la Scandinavie que les écosystèmes tempérés dont le Bassin d'Arcachon constitue la limite méridionale. Ainsi, on estime que *Mytilus edulis* est largement distribuée dans la zone boréale-tempérée jusque dans les régions subarctiques (Newell, 1989). De plus, cette moule a la capacité de supporter de larges fluctuations de salinité, dessiccation, température et teneurs en oxygène, ce qui fait qu'elle occupe une grande variété de micro-habitats, des régions intertidales les plus élevées aux régions subtidales, ainsi que des estuaires aux eaux de mer entièrement océaniques. Ainsi, tolérante à un large éventail de conditions environnementales, la moule bleue est une espèce euryhaline, qui se trouve aussi bien dans les eaux marines (34 ppt) que saumâtres (5 à 18 ppt), et eurytherme, pouvant supporter des conditions glaciales pendant plusieurs mois, comme dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada), mais aussi des températures élevées pour des organismes marins ; la température létale est estimée à 29°C environ en immersion (Bayne *et al.*, 1977 ; Mallet, 1989 ; Sukhotin et Kulakowski, 1992). Son optimum thermique est compris entre 10 et 20°C. Les animaux vivant au niveau de l'estran doivent faire preuve de remarquables processus de résistance notamment aux stress anoxiques/hyperoxiques, thermiques et mécaniques. En effet, ils

doivent être capables d'endurer, à marée basse, plusieurs heures sans apport d'oxygène tout en étant exposés aux températures élevées estivales (ou faibles hivernales) avant de recouvrer brutalement les conditions aquatiques locales à marée montante. De plus, ils sont contraints de résister aux courants et aux vagues.

- Espèces « cousines »

Sur les côtes de l'Atlantique Nord, trois espèces principales du genre *Mytilus* ont été identifiées : *M. edulis*, *M. galloprovincialis* et *M. trossulus* (McDonald *et al.*, 1991 ; Gosling, 1992 ; Hilbish *et al.*, 2000). Les processus physiologiques propres à chaque espèce joueraient, en partie, un rôle limitant dans leur distribution (Gardner, 1994). Pour *M. edulis* et *M. galloprovincialis*, une tolérance thermique différente serait le facteur restreignant leur distribution (Hilbish *et al.*, 1994), alors que pour *M. edulis* et *M. trossulus* celle-ci résulterait d'une dépendance à la salinité différente (Johannesson *et al.*, 1990). Par ailleurs, les trois espèces sont discriminables par des critères anatomiques et morphologiques, ainsi que par des marqueurs génétiques : hauteur de la coquille, longueur des cicatrices des muscles antérieur et postérieur rétracteurs (McDonald *et al.*, 1991 ; Gardner, 1996), ADN mitochondrial et expression d'alloenzymes (Edwards et Skibinski, 1987 ; Koehn, 1991 ; Gosling, 1992; Venier *et al.*, 2003). Malgré ces critères, le statut taxonomique de ces trois espèces reste controversé et, compte tenu de leur proximité phylogénétique et du recouvrement partiel de leurs aires de répartition géographique, ces trois espèces peuvent s'hybrider (Gosling, 1992 ; Comesaña *et al.*, 1999 ; Daguin *et al.*, 2001). Dans le Pacifique, d'autres taxons ont été décrits : *Mytilus californianus* sur les rivages de l'Amérique du Nord, *Mytilus coruscus* sur les côtes asiatiques et *M. chilensis* sur les côtes du Chili et des îles Malouines.

A.2 Intérêt commercial de la moule bleue

Mytilus edulis est pêchée commercialement depuis des siècles en Europe où on la récoltait sur les rochers à marée basse. Dès le 19^{ème} siècle, en raison de la surexploitation des gisements naturels, différents types de cultures se sont développés : cultures intertidales sur des piquets en bois appelées « bouchots », cultures subtidales à plat, cultures en suspension (corde, filières). La moule bleue est maintenant aussi cultivée au Canada Atlantique grâce au système d'élevage en suspension : les moules grossissent dans des boudins en filet, suspendus à des filières (Figure 3).

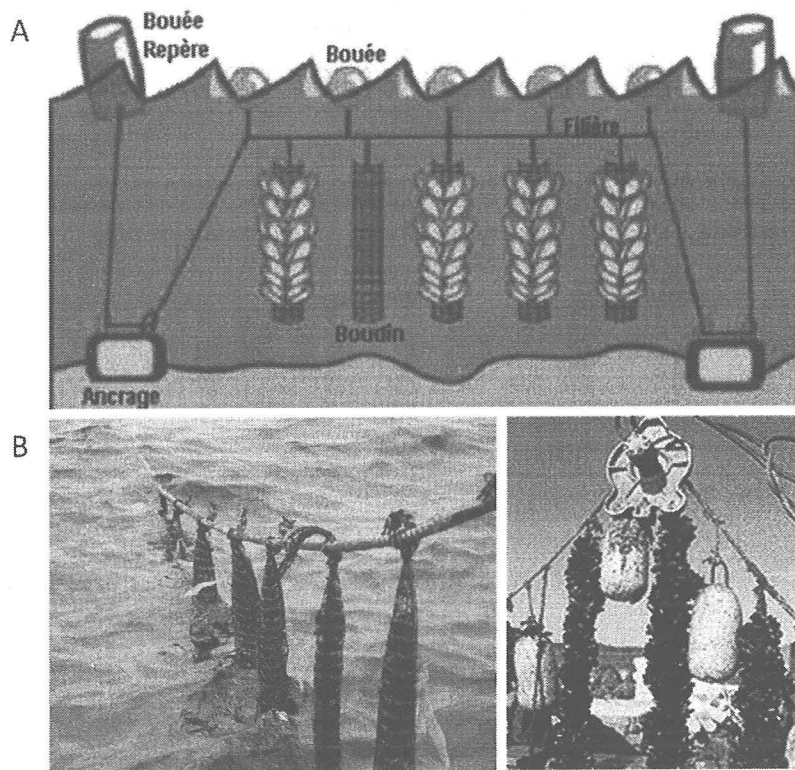


Figure 3: Système de culture de moules bleues sur filières. A) Schéma illustrant la méthode de culture – B) Illustrations de la récolte de moules sur filière (Source : Pêches et Océans Canada)

La production globale des cultures de *Mytilus edulis* a augmenté de 48 % en 2002 (386.000 tonnes) par rapport à l'année 1991 (262.000 tonnes). Cependant, la production était extrêmement

variable durant cette décade où un pic de plus de 500.000 tonnes a été atteint en 1998, suivi d'une baisse générale (*Figure 4*). La production en France est restée presque constante durant cette période alors qu'elle a montré une augmentation en Irlande et en Grande-Bretagne (FAO).

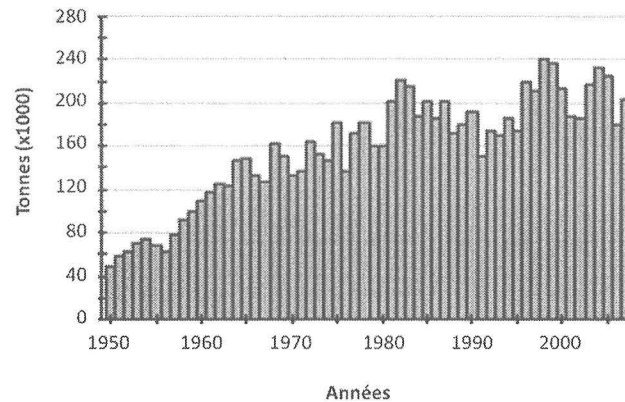


Figure 4 : Production globale d'aquaculture de *Mytilus edulis* depuis 1950 (Source : FAO Fishery Statistic)

Au Canada, la moule est maintenant la première espèce cultivée dans l'est du pays et son élevage représente la principale activité maricole au Québec et à l'Île du Prince Édouard. En 2004, la mytiliculture a généré au Canada des ventes d'une valeur totale de 32,8 millions de dollars ce qui représente 8% des ventes mondiales (FAO). Dominée par l'Île du Prince Édouard où le secteur génère dans son ensemble 106 millions de dollars, la production mytilicole connaît une augmentation constante dans l'est du pays depuis une décennie. Au cours des cinq dernières années, de plus en plus de moules ont été exportées, surtout aux États-Unis. Le principal exportateur canadien est l'Île-du-Prince-Édouard, laquelle fournit 80% des moules bleues consommées en Amérique du Nord. En 2001, cette province a exporté pour plus de 22,5 millions de dollars de moules, représentant plus de 90 % du total pour l'ensemble du Canada (Pêches et Océans Canada).

Différents problèmes peuvent être rencontrés dans les élevages tels qu'une température de l'eau trop élevée pendant l'été ou la prédation par les crabes, les étoiles de mer et les oiseaux, ainsi que

l'arrivée d'espèces aquatiques envahissantes. Par exemple, sur l'Ile du Prince Édouard, la venue de différentes espèces de tuniciers au cours des dernières années a causé et cause encore des difficultés additionnelles aux mytiliculteurs, aux transformateurs, aux biologistes et à tous les intervenants de l'industrie (Locke *et al.*, 2007). Aussi, la contamination par les bactéries pathogènes ainsi que l'accumulation de toxines produites par certaines algues microscopiques représentent des sources importantes de problèmes économiques mais aussi de santé humaine.

Au cours des dernières décennies, la forte activité anthropique a engendré des perturbations environnementales majeures à l'échelle planétaire. Conséquence des fortes émissions de gaz à effet de serre, les conditions environnementales des eaux marines et côtières sont perturbées conduisant ainsi à l'émergence de microorganismes pathogènes dont les souches bactériennes *Vibrio splendidus*.

B- Les vibrios

Le terme « *Vibrio* » est couramment utilisé pour se référer aux bactéries appartenant au genre *Vibrio*, qui comprend plus de 30 espèces, ou à la famille des Vibrionaceae (Classe des Gamma Proteobacteria) (Farmer *et al.*, 2005). Les vibrios se présentent sous la forme de petits bacilles Gram-négatifs ($0.5 - 0.8 \times 1.4 - 2.6 \mu\text{m}$), souvent de forme incurvée dite « en virgule ». Ils se caractérisent par une grande mobilité liée à la présence d'un flagelle unique : la ciliature polaire avec des fourreaux leur permettant des déplacements très rapides suivant une trajectoire rectiligne.

Les vibrios, bactéries anaérobies facultatives, sont omniprésents dans les environnements naturels marins et estuariens incluant les sédiments et l'eau. La distribution des espèces dépend des facteurs environnementaux comme la concentration en nutriments, la température et,

principalement, les concentrations en sodium (salinité) (Farmer *et al.*, 2005). Les vibrios peuvent être dans ou associés avec des organismes tels que les coraux, les poissons, les mollusques, les algues, les éponges et le zooplancton (Huq et Colwell, 1995 ; Vandenberghe *et al.*, 2003 ; Thompson *et al.*, 2005 ; Pruzzo *et al.*, 2005). Selon la souche, l'hôte et l'environnement, la nature de l'association est rangée du commensalisme au pathogénique (Le Roux et Austin, 2006).

La présence de bactéries a souvent été observée chez les mollusques comestibles, avec une prédominance marquée pour les bactéries Gram-négatives du genre *Vibrio* (Cellura *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs espèces de vibrios ont été associées à des maladies liées à l'alimentation et quelques unes sont pathogènes pour l'Homme (Chakraborty *et al.*, 1997) et peuvent causer de sérieuses infections intestinales (par exemple *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*), des infections aux blessures et des septicémies primaires (*V. vulnificus*) (Huq et Colwell, 1995 ; Thompson *et al.*, 2005 ; Farmer *et al.*, 2005 ; Farmer et Hickman-Brenner, 2006 ; Miyoshi, 2006). D'autres vibrios ont été associés avec des infections d'organismes aquatiques comme les poissons (par exemple avec *V. anguillarum*, *V. ordalii* et *V. salmonicida*), les crustacés (par exemple avec *V. harveyi* et *V. penaeicida*), les mollusques bivalves (par exemple avec *V. tapetis*, *V. splendidus*, *V. pectenocida*) et les coraux (*V. shiilonii*, *V. coralliilyticus*) (Thompson *et al.*, 2005 ; Paillard *et al.*, 2004 ; Austin, 2006a, b ; Crosa *et al.*, 2006 ; Le Roux et Austin, 2006 ; Owens et Busico-Salcedo, 2006). Les vibrios ne sont pas exclusivement pathogènes pour une seule espèce hôte. Par exemple, *V. alginolyticus*, connu pour être pathogène pour l'Homme (Farmer *et al.*, 2005), est aussi pathogène pour les poissons, les crustacés et les mollusques bivalves (Austin, 2006b).

La virulence des vibrios pathogènes est liée à plusieurs facteurs incluant les hémolysines, les sidérophores, les facteurs adhésifs, les protéases, les lipases, et différentes toxines. Les hémolysines sont probablement les toxines les plus largement présentes parmi les souches pathogènes (Zhang et Austin, 2005). Les vibrios pathogènes pour l'Homme, les vertébrés et les invertébrés aquatiques sont connus pour acquérir les facteurs de virulence par un transfert horizontal de plasmides ou de transposons d'autres bactéries ou bactériophages (Cotter et DiRita, 2000 ; Austin et Zhang, 2006).

B.1 *Vibrio splendidus*

Vibrio splendidus est une espèce halophile couramment présente comme un composant du bactérioplancton marin (Thompson *et al.*, 2005). Cette espèce semble être particulièrement dominante parmi les vibrios retrouvés dans les zones géographiques de basses températures (Urakawa *et al.*, 1999). Les souches de *Vibrio splendidus* isolées de l'eau de mer possèdent une extrême diversité génotypique, avec au moins une centaine de génotypes distincts qui coexistent à de très basses concentrations environnementales. De plus, une variation saisonnière dans l'abondance est observée, et, la variation du génotype considérée comme neutre signifie que de nombreux génotypes coexistent sans ribotype dominant (Thompson *et al.*, 2005).

Vibrio splendidus a été isolé à partir des sédiments (Sobecky *et al.*, 1998 ; Mateo, 2006) et des organismes marins, notamment des mollusques bivalves (Hariharan *et al.*, 1995 ; Mateo, 2006). Différentes souches de cette espèce sont considérées comme pathogènes pour les bivalves cultivés (Sugumar *et al.*, 1998 ; Gómez-León *et al.*, 2005 ; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2009) et les poissons (Gatesoupe *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2003 ; Thomson *et al.*, 2005). Par exemple, pour les larves des moules *Perna canaliculus*, une souche de *Vibrio splendidus* cause le détachement des cils, une nécrose et une vacuolisation de la région digestive (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2009). Divers souches de *Vibrio splendidus*, incluant les souches TNEMF6, TNNIII7, Mel31 et LGP32 (précédemment appelé Mel32), ont aussi été associées à des mortalités des juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* (Lacoste *et al.*, 2001a ; Waetcher *et al.*, 2002 ; Le Roux *et al.*, 2002 ; Gay *et al.*, 2004a, b). De plus, les effets pathogènes de *V. splendidus* ont été démontrés lors d'infections expérimentales *in vivo* et *in vitro* chez *C. gigas* (Allam et Ford, 2006), chez *Mya arenaria* (Araya *et al.*, 2009, 2010 ; Mateo *et al.*, 2009a,b, 2010) et chez *Mytilus galloprovincialis* (Li *et al.*, 2008).

La présence de protéases extracellulaires est considérée comme un facteur important de la pathogénicité des souches de *V. splendidus* (Farto *et al.*, 2006 ; Vasquez *et al.*, 2006), et la vulnérabilité des juvéniles de *C. gigas* à *V. splendidus* est augmentée par le stress (Lacoste *et al.*, 2001b).

B.2 *Vibrio splendidus* souche LGP32

Vibrio splendidus LGP32 a été isolé d'huîtres malades souffrant du syndrome de mortalité estivale en France et a été démontré être virulent après injection chez des huîtres (Gay *et al.*, 2004a, b).

Récemment, le génome complet de cette souche a été séquencé (Le Roux *et al.*, 2009). Il consiste en 2 chromosomes circulaires de 3.29 Mb et 1.67 Mb contenant 2998 et 1500 cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame*, ORF) prédites pour les chromosomes 1 et 2, respectivement. Bien que les 2 chromosomes aient un pourcentage comparable de gènes inconnus, le chromosome 1 comporte de loin le plus haut pourcentage de gènes codant pour diverses fonctions biologiques dont les processus cellulaires essentiels. De plus, le chromosome 1 contient un grand nombre de gènes d'ARNr et d'ARNt en comparaison avec le chromosome 2. Les similarités relevées au niveau des chromosomes 1 et 2 indiquent que *V. splendidus* LGP32 est fortement proche de *V. vulnificus* et *V. harveyi*. La plupart des gènes qui sont conservés parmi les espèces de vibrios sont localisés sur le chromosome 1, suggérant que le chromosome 2 est sujet à des réarrangements génomiques réguliers (Dryselius *et al.*, 2007). Contrairement aux autres vibrios, LGP32 contient un petit intégron chromosomique avec un nombre limité de cassettes (Le Roux *et al.*, 2009). L'intégron est divisé en deux rangées. La plateforme fonctionnelle, portant le gène *intI*A qui code pour l'intégrase et le site d'attachement *attI*, est trouvé sur le chromosome 1 et contient 20 cassettes (VS_II869-1889; 15.5kb). La seconde rangée contenant seulement 5 cassettes est présente sur le chromosome 2 et porte les gènes VS_II0832 à VS_II0828. Une des cassettes présentes sur l'intégron code pour une dihydrofolate réductase phylogénétiquement proche du gène *dfr* qui confère une résistance au triméthoprim (Trim^R) (Le Roux *et al.*, 2009).

Le génome LGP32 présente plusieurs séquences homologues à des gènes associés à la virulence incluant les toxines potentielles telles que les hémolysines, les protéases, un système de sécrétion de type IV, les gènes pour le transport sidérophore, les adhésines ainsi que des gènes impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens et aux antibiotiques (Cattoir *et al.*, 2007 ; Le Roux *et al.*, 2009). La distribution différente de ces gènes parmi les souches de *V. splendidus* peut expliquer la virulence variable observée chez les animaux aquatiques (Le Roux *et al.*, 2009).

Parmi les toxines, la métalloprotéase (*vsm*) (ou métalloprotéinase) a été identifiée comme déterminante dans la toxicité des produits extracellulaires de *V. splendidus* LGP32 (Le Roux *et al.*, 2007; Binesse *et al.*, 2008). Cependant, des études récentes ont exploré le chemin d'infection et les processus pathogéniques de *V. splendidus* LGP32 et la protéine externe de membrane (OMP pour *Outer Membrane Protein*) OmpU a été montrée être essentiel dans la virulence de LGP32 lors d'infections d'huîtres (Duperthuy *et al.*, 2010, 2011). OmpU est une porine importante chez les espèces de vibrios.

Ainsi, les OMPs sont utilisées par des pathogènes pour l'interaction avec les cellules hôtes et l'invasion. Elles servent de protéines d'adhésion (les adhésines) (Negm and Pistole, 1999; Soulas *et al.*, 2000) ou de protéines d'invasion (les invasines) (Virji *et al.*, 1994; Sa *et al.*, 2010). De plus, les OMPs, étant des composants de la surface bactérienne, elles sont aussi utilisées par l'hôte pour la reconnaissance du pathogène. D'ailleurs, les hémocytes des bivalves possèdent des récepteurs très divers donnant de hautes spécificités à la reconnaissance du pathogène (Roger *et al.*, 2008; Moné *et al.*, 2010).

Grâce à des expériences d'invasion des hémocytes *in vitro* et des infections *in vivo*, Duperthuy *et al.* (2011) ont démontré que LGP32 est un pathogène intracellulaire qui envahit les cellules immunitaires des huîtres en utilisant OmpU comme une adhésine ou une invasine. Dans ce processus, la superoxyde dismutase plasmatique Cg-EcSOD est utilisée comme une opsonine reconnue à travers sa séquence RGD (Arginine, Glycine et Acide Aspartique) par les β -intégrines des hémocytes. Comme OmpU, les OMPs des pathogènes intracellulaires peuvent être des intermédiaires dans l'adhérence des cellules hôtes, en stimulant la voie de transduction de l'hôte requise pour l'entrée des bactéries. Ainsi la reconnaissance de OmpU par les cellules hôtes entraîne un bouleversement du cytosquelette d'actine de ces cellules et induit l'expression de gènes résultant en une polymérisation de l'actine et de la clathrine (Duperthuy *et al.*, 2011).

I.2 Immunité innée chez les bivalves

A- Immunité innée et immunité adaptative

Toutes les espèces animales sont confrontées de façon quotidienne à un grand nombre de microorganismes (bactéries, champignons, parasites protozoaires, virus) qui peuvent affecter leur santé et même leur survie. Deux systèmes de défense s'opposent à ces microorganismes : un système appelé l'immunité innée, qui est commun à tous les animaux, y compris l'homme, et un système immunitaire adaptatif (ou spécifique) qui est présent exclusivement chez les vertébrés. Le système adaptatif coexiste chez tous les vertébrés avec une puissante réponse immunitaire innée (Janeway *et al.*, 2005). L'immunité innée représente la première ligne de défense. Les réponses immunitaires impliquent d'abord la reconnaissance du non-soi, suivies par l'activation d'une réponse défensive visant à tuer ou à inactiver l'invasif, et finalement à réparer les dommages infligés aux cellules hôtes (Mydlarz *et al.*, 2006).

Chez les bivalves, comme chez les autres invertébrés, les défenses contre les pathogènes sont reliées au système de l'immunité innée. Pour distinguer le soi ou le non-soi, le système immunitaire possède la capacité à reconnaître des molécules conservées pendant l'évolution, telles que les lipopolysaccharides (LPS) ou les peptidoglycanes, connues comme « patrons moléculaires associés aux pathogènes » (PAMPs pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ces PAMPs sont présents chez presque tous les microorganismes mais absents des organismes supérieurs (Janeway, 1989). Les cellules de l'hôte identifient les PAMPs grâce à des récepteurs connus comme « récepteurs de reconnaissance du patron » (PRRs pour *Pattern Recognition Receptors*) (Janeway et Medzhitov, 2002). La reconnaissance et les réponses générées impliquent aussi bien des processus cellulaires qu'humoraux permis grâce à l'activation de cellules immunocompétentes, les hémocytes. Pendant la dernière décennie, différentes études ont

déterminé les mécanismes par lesquels les mollusques interagissent avec les microorganismes pathogènes (Lane et Birkbeck, 2000 ; Canesi *et al.*, 2002 ; Pruzzo *et al.*, 2005 ; Allam *et al.*, 2006).

Différent du système de l'immunité innée, le système immunitaire adaptatif repose sur des cellules et des processus systémiques hautement spécialisés. Les réponses complexes et spécifiques ainsi qu'une capacité de mémoire, données par les lymphocytes, procurent au système immunitaire des vertébrés la capacité d'identifier et de se rappeler les microbes pathogènes spécifiques. Ainsi, lors des contacts ultérieurs avec le même agent pathogène, les réponses sont plus fortes et plus efficaces (Roch, 1999 ; Iwanaga et Lee, 2005).

De récentes revues suggèrent que les invertébrés possèdent un mécanisme immunitaire qui pourrait être, d'une façon ou d'une autre, similaire à l'immunité adaptative des vertébrés (Flegel, 2007 ; Rowley et Powell, 2007). En effet, des preuves d'une haute spécificité dans l'immunité des invertébrés ont été démontrées chez les bourdons (*Bombus terrestris*) (Sadd et Schmid-Hempel, 2006). Dans cette étude, trois espèces différentes de bactéries ont été inoculées à une sous population de bourdons ; puis 8 et 22 jours plus tard, les insectes ont tous été primo-infectés ou réinfectés avec les mêmes bactéries. Le taux de survie des bourdons est apparu comme significativement plus élevé pour ceux qui ont été réinfectés par les bactéries. D'autres indices ont également été décrits chez des crevettes (Flegel et Pasharawipas, 1998). Il y a une vingtaine d'années, nombre d'élevages de crevettes ont souffert d'une série d'épizooties virales. En effet, différents virus (« *White Spot Syndrome Virus* » (WSSV), « *Taura Syndrome Virus* » (TSV) et « *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* » (IHHNV)) ont causé des mortalités importantes dans les élevages de *Penaeus vannamei* (Bonami et Lightner, 1991). Deux ans après la première manifestation, la sévérité des maladies a semblé décliner dans les écloséries frappées par les virus (Flegel, 2007), suggérant le développement d'une résistance virale chez ces crevettes (Tsai *et al.*, 1999). Toutefois, ces crustacés sont incapables d'éliminer les pathogènes et restent donc porteurs ; ils peuvent transmettre la maladie aux individus naïfs. Aussi les immunologistes considèrent qu'il s'agit là d'un phénomène de tolérance, plutôt que d'une

résistance acquise. Flegel et Pasharawipas (1998) ont proposé le concept d'«acclimatation virale» qui suggère que «des larves de crevettes exposées aux virus X avant d'être des post larves 10 (PL10) sont capables d'acquérir un type de mémoire qui pourrait les protéger spécifiquement de l'apoptose déclenchée par le virus X». Cependant, des mortalités importantes ont été reportées quand les stocks de TSV-tolerants de *P. vannamei* ont été exposés au WSSV virus (Moss, 2002 ; Moss *et al.*, 2005). En effet, comme pour la résistance des vertébrés, cette «tolérance» des crevettes est spécifique d'un pathogène viral particulier et il n'y a donc pas de protection contre les virus pour les crevettes n'ayant pas été précédemment exposées.

B- La défense cellulaire : les hémocytes

Le système cellulaire immunitaire est relié à des cellules compétentes immunitaires, appelées les hémocytes. Ils représentent les cellules circulatoires des mollusques. Différentes fonctions incluant la digestion et le transport des nutriments, la formation de la coquille et sa réfection, la réparation des blessures, l'excrétion et les défenses internes (Cheng 1981, 1984 ; Canesi *et al.*, 2002) ont été attribuées aux hémocytes.

B.1 Les types d'hémocytes

Différents types et sous-types d'hémocytes ont été décrits sur la base de critères morphologiques, fonctionnels et/ou d'affinités différentielles pour des colorants histologiques. La classification des hémocytes semble varier selon la stratégie d'identification utilisée. Certaines approches utilisent un gradient de densité pour séparer et/ou identifier des cellules (Friebel et Renwranz, 1995 ; Pipe *et al.*, 1997) ou plus récemment la cytométrie en flux (Hégaret *et al.*, 2003a, b ; Allam *et al.*, 2002 ; García-García *et al.*, 2008), et d'autres la microscopie électronique (Travers

et al., 2008) ou les colorations chimiques (Cima *et al.*, 2000). Par exemple, en utilisant un gradient continu de Percoll, Pipe *et al.* (1997) ont séparé les hémocytes de *M. edulis* en trois couches distinctes et identifié deux types d'hémocytes en utilisant la microscopie électronique, des essais sur les fonctions des hémocytes (phagocytose et activité du stress oxydant) et les capacités des lectines.

Bien que la classification des hémocytes des mollusques fasse encore débat, il apparaît consensuel que deux types cellulaires dominent : les granulocytes et les agranulocytes (hyalinocytes), selon la présence ou l'absence de granules (Cheng, 1981). Les granulocytes ont un nombre varié de granules, forment des filopodes, et sont activement impliqués dans la phagocytose, alors que les hyalinocytes possèdent un cytoplasme clair ne contenant que peu ou pas de granules, forment des lobopodes, et sont plus petits que les granulocytes (Cheng, 1984) (Figure 5). Les hyalinocytes semblent impliqués dans la production de la matrice extracellulaire pendant une guérison de blessure (Cajaraville et Pal, 1995).

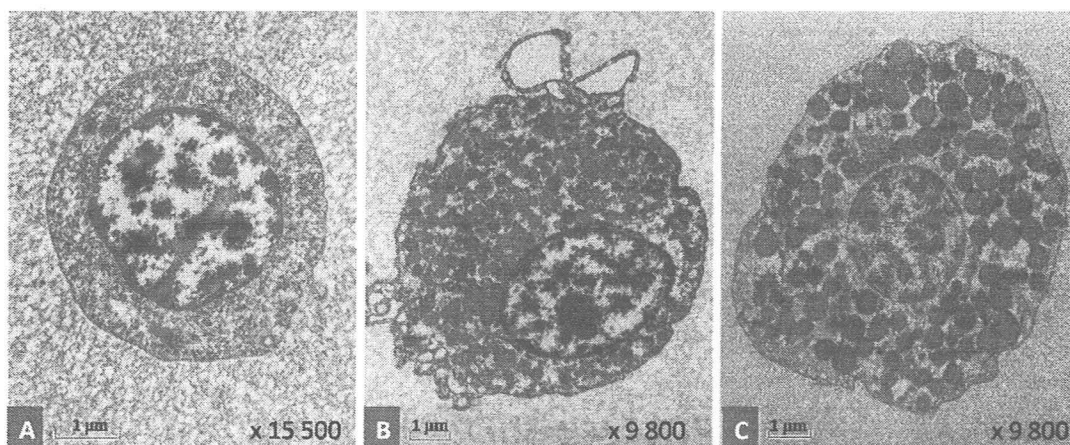
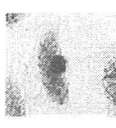
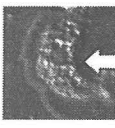
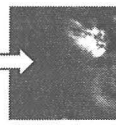
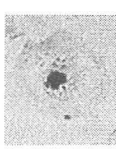

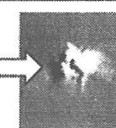
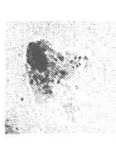



Figure 5 : Hémocytes de *Mytilus edulis* classés comme : A) Hyalinocyte typique ne contenant peu ou pas de granules, B) Granulocytes contenant des petites granules et C) Granulocytes contenant de grandes granules (Source : Pipe, 1990a).

Les deux types cellulaires ont été identifiés chez plusieurs mollusques incluant *M. edulis* (Pipe, 1990a ; Pipe *et al.*, 1997), *C. virginia*, *R. philippinarum*, *M. mercenaria* (Allam *et al.*, 2002), *M. arenaria* (Synard, 2008), *S. glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007a) et *C. gigas* (Chang *et al.*, 2005). Les proportions des deux types cellulaires varient entre les espèces (Cima *et al.*, 2000 ; Hégaret et Wikfors, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Parisi *et al.*, 2008 ; Allam *et al.*, 2001 ; Synard, 2008) et peuvent également fluctuer à travers une même espèce selon les conditions environnementales (Hauton *et al.*, 2000 ; Hégaret *et al.*, 2003a, b ; Gagnaire *et al.*, 2006). En effet, Hégaret et Wikfors (2005) ont montré que la composition des hémocytes varie en fonction de la saison, et donc de la température, et de la disponibilité en nourriture.

En corrélant les résultats de différentes approches technologiques: les analyses de profils des mouvements sur des cellules vivantes, les colorations histologiques et la cytométrie en flux, Le Foll *et al.* (2010) ont proposé une classification fonctionnelle intéressante des hémocytes de *M. edulis*. En considérant les propriétés histologiques et de mobilité des cellules, ils ont décrit trois types cellulaires distincts : les granulocytes éosinophiles, les hyalinocytes et les basophiles (voir *Tableau 1*). Comme montré dans d'autres études, les granulocytes sont engagés dans la phagocytose. Les basophiles, quant à eux, sont impliqués dans la dynamique des interactions hémocytes-hémocytes et dans la constitution du cœur des agrégations. Les hyalinocytes forment une population hétérogène. Ils sont capables de propagation et de rétrécissement remarquable et possèdent une faible activité phagocytaire. De plus, ces auteurs démontrent des modifications rapides (de l'ordre de la minute) de l'aspect des hémocytes *in vitro* avec des transitions bidirectionnelles des contours écartés aux morphologies condensées des corps des cellules. Des types de locomotions amiboïdes et non-amiboïdes sont observés qui dépendent de la forme et des types de cellules, avec une vitesse de $30 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$.

Tableau 1 : vue d'ensemble des sous-populations d'hémocytes des moules *Mytilus edulis* proposée par Le Foll *et al.* (2010)

Type cellulaire	Taille (μm) ^a	Granules ^b	Capacité de phagocytose ^c	Autres Fonctions	Coloration des granulations intracellulaires après une coloration avec de l'Hemacolor	Apparence avec « Hoffman modulation contrast » et types de mobilité ^d	Autres Remarques
Granulocytes éosinophiles	10	Granules acides Phagosome	Haute			  Amiboïdes Basés sur les filopodes	Phagocytes professionnels
Hyalinocytes	10	Pas de granules Phagosome	Faible	Production de la matrice extracellulaire (guérison de blessure) (Kagawa et al. 1975)		  Amiboïdes Basés sur les filopodes	Population hétérogène
Basophiles	7	Semi-granulaire Granules basiques	Non	Dynamique des interactions hémocytes-hémocytes Constitution du cœur des agrégations		 Basés sur les filopodes	Peuvent être regroupés en Hyalinocytes *

a La taille correspond aux diamètres des cellules en suspension dans l'hémolymphe, déterminée en utilisant le canal «Coulter-type electronic volume (EV)» du cytomètre en flux, après un calibrage avec des microsphères FlowCheck de 10 μm .

b Les granules se réfèrent à la coloration des granulations intracellulaires après une coloration avec de l'Hemacolor

c Capacité à phagocyter 3 et plus de 3 microbilles fluorescentes de 2 μm .

d Pour les hyalinocytes et les éosinophiles, une diffusion et une forme condensée de la même cellule sont montrées. Les changements de la morphologie sont indiqués par les flèches.

* Quelques auteurs considèrent seulement deux types d'hémocytes de moule ; dans quelques échantillons, seulement deux populations peuvent être distinguées par cytométrie de flux.

B.2 Ontogénèse

L'origine des hémocytes reste encore inconnue. Cependant, quelques études suggèrent que les hémocytes résultent de la différenciation des tissus cellulaires connectifs (Cheng, 2000). A partir d'observations microscopiques, plusieurs théories concernant l'ontogénie ont été proposées et

résumées par Auffret (1988). Certains proposent une origine commune dans les leucoblastes (Mix, 1976) alors que d'autres considèrent des lignées séparées des granulocytes et des hyalinocytes (Cheng, 1981). Des granuloblastes ou des pro-hémocytes agranulaires correspondraient aux précurseurs des granulocytes alors que des hyalinoblastes ou des pro-hyalinocytes se différencieraient en hyalinocytes. Alors que ces cellules sont hypothétiques, certaines recherches ont identifié des cellules comme étant possiblement des précurseurs des hémocytes. Elles sont décrites comme des cellules blastiques ou hémoblastes qui sont caractérisées par un grand ratio noyau/cytoplasme et un manque d'organelles (Hine, 1999 ; Cima *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2005 ; Aladaileh *et al.*, 2007a ; Matozzo *et al.*, 2008) (Figure 6).

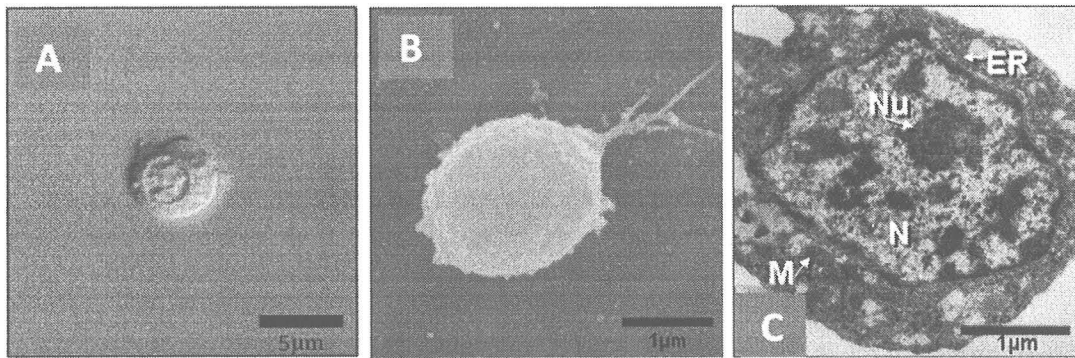


Figure 6 : Observations des hémoblastes de *S. glommera* : A) En microscopie à contraste d'interférence différentielle des hémocytes vivants, ils sont définis par une forme sphérique avec un haut ratio noyau: cytoplasme. Ces cellules ne sont pas mobiles et ont un diamètre d'environ $4.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$. B) En microscopie électronique à balayage, ils sont caractérisés par une petite taille et une forme ronde. C) En microscopie électronique en transmission, ils sont caractérisés par un grand noyau (N) avec un seul nucléole (Nu) ; le cytoplasme contient réticulum endoplasmique (ER) et mitochondries (M) (Source : Aladaileh *et al.*, 2007a).

B.3 Rôle des hémocytes lors d'une inflammation

Les hémocytes représentent la principale ligne de défense des mollusques (Hoffmann, 1999). Ils sont activement impliqués dans les processus inflammatoires et peuvent être activés par une

blessure ou par un corps vivant ou inerte (Feng, 1988). Lors d'une blessure, le processus de cicatrisation débute par la migration des hémocytes jusqu'aux tissus blessés, se poursuit par la formation d'un bouchon (clou hémoblastique) formé par les hémocytes agrégés; le remplacement des tissus endommagés, le dépôt de collagène et l'élimination des tissus nécrosés interviennent ensuite (Champeau, 2005). Quand des microorganismes sont la cause de l'inflammation, les hémocytes sont attirés par chimiotactisme (Feng, 1988) et le processus de phagocytose se met en place.

Les hémocytes produisent également des produits extracellulaires tels que les peptides antimicrobiens, ayant des effets bactéricides et bactériostatiques, et des lectines, qui sont utilisées comme molécules liantes avec les pathogènes.

C- Les défenses humorales

Les composants humoraux, contenus dans l'hémolymphe des mollusques bivalves, sont composés de plusieurs molécules solubles, incluant les lectines, les peptides antimicrobiens, les enzymes hydrolytiques dont le lysozyme, les protéines de choc thermique et les prophénoloxydases (proPO). D'autres constituants tels que l'oxyde nitrique, les inhibiteurs de protéases et les cytokines jouent également un rôle dans le système immunitaire.

C.1 Les lectines

Les lectines (ou glycoprotéines) sont des protéines se liant spécifiquement et de façon réversible à certains glucides et facilitent la phagocytose chez tous les taxons (Olafsen 1995, 1996). La

fonction des lectines chez les organismes inférieurs peut être considérée comme similaire au rôle joué par les anticorps chez les vertébrés. Elles permettent d'identifier le « non-soi » grâce à la reconnaissance des structures de glucides présents à la surface des microorganismes (Vasta et Marchalonis, 1987).

Différentes familles de lectines ayant des structures différentes sont connues. Les plus communes sont les lectines de type C et les lectines de type S (ou galectines). Cependant, d'autres familles de lectines comprennent les types I, P et les ficolines (Kilpatrick, 2002 ; Venier *et al.*, 2011). La plupart des lectines des invertébrés, incluant celles des bivalves, sont de type C. Ces lectines requièrent des cations divalents, en particuliers le Ca^{2+} , pour l'agglutination, mais peuvent être inhibées par le Zn^{2+} (Olafsen 1995, 1996).

Les lectines sont retrouvées chez de multiples bivalves tels que les huîtres, où elles sont connues sous le terme générique de gigalectines (Olafsen, 1995), les coquilles Saint-Jacques, les pétoncles, les moules et les palourdes (Wang *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Yamaura *et al.*, 2008 ; Olafsen, 1995). Chez les bivalves, elles sont synthétisées dans les hémocytes et retrouvées dans le sérum (les lectines humorales) aussi bien qu'à la surface de la membrane plasmique des cellules circulantes phagocytaires (les lectines attachées aux cellules). Leurs rôles d'opsonisation et d'agglutination résultent de leur capacité à lier la surface des hémocytes avec celle des microorganismes envahissants (Olafsen 1995 ; 1996). Canesi *et al.* (2002) ont suggéré que les lectines peuvent, soit agir comme un pont entre les bactéries et les hémocytes (rôle des opsonines) et faciliter ainsi la phagocytose, ou bien entraîner l'immobilisation des pathogènes envahissants par agglutination, et ainsi un confinement de l'infection.

Chez *M. galloprovincialis*, plusieurs types de lectines (des lectines de type C, des lectines liant l'acide sialique, des fucolécines, des galectines) ont été caractérisés (Venier *et al.*, 2009; 2011). Les lectines de types C sont considérées comme étant des PRRs par plusieurs auteurs (Jing *et al.*, 2011; Venier *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011) et la diversité des séquences de lectines de ce type identifiées peut répondre à la variété des pathogènes. Chez d'autres invertébrés aquatiques, tels

que les crustacés, les lectines semblent activer le système prophénoloxydase (proPO) en plus de leur rôle dans la reconnaissance du « non-soi » (Marques et Barracco, 2000).

C.2 Le système du complément C1q

Le système du complément représente un mécanisme de défense sophistiqué et puissant, composé de plus de 30 sérums solubles et de protéines de la surface des cellules. Chez les vertébrés, il joue des rôles essentiels dans l'immunité innée et adaptative des défenses de l'hôte (Nokana *et al.*, 2000 ; Boshra *et al.*, 2006). Habituellement, le système du complément peut être activé grâce à 3 voies : la voie classique dépendante d'anticorps, la voie alternative indépendante d'anticorps et la voie des lectines. Le C1q, comme sous composant du complexe complément C1, est une cible de reconnaissance protéique de la voie classique du complément. Il joue un rôle crucial dans la reconnaissance des pathogènes et des complexes anticorps-antigènes et mène à l'immunité adaptative (Kishore *et al.*, 2004). Par ailleurs, C1q est considéré comme une protéine de reconnaissance du patron versatile (PRP pour *Pattern Recognition Protein*), se liant directement à une large variété de PAMPs des bactéries, virus et parasites. De ce fait, il permet le déclenchement de la phagocytose du pathogène (Medzhitov et Janeway, 2002 ; Bohlson *et al.*, 2007). En raison des propriétés liantes de son domaine globulaire gC1q, le C1q agit comme une lectine et active le système du complément. Il est ainsi considéré pour être un lien principal entre la voie classique de l'immunité innée et de l'immunité acquise (Kishore et Reid, 2000). En plus de leur rôle fondamental dans le système du complément, les protéines C1q sont impliquées dans des processus immunologiques incluant l'apoptose, l'inflammation, l'adhésion et la différenciation des cellules (Kishore *et al.*, 2004).

Chez les mollusques et d'autres invertébrés ne possédant pas d'immunité adaptative, les protéines « C1-q domain containing » (C1q-DC) sont abondantes. Ces protéines sont caractérisées par un domaine globulaire d'environ 140 résidus dans la partie C-terminale avec 8 résidus hautement conservés (Tom Tang *et al.*, 2005). Elles ont probablement émergé comme des lectines, et grâce

aux propriétés d'interaction de gC1q, évolué dans une classe spécialisée de reconnaissance des structures (Gerdol *et al.*, 2011). Chez les mollusques, le rôle des protéines C1q-DC dans une reconnaissance spécifique du pathogène n'a été étudié que récemment : une sur-expression des gènes codant pour C1q-DC a été observée lors d'infections avec des bactéries et des parasites métazoaires chez *R. decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009), *B. glabrata* (Adema *et al.*, 2010), *C. gigas* (Taris *et al.*, 2009) et *M. mercenaria* (Perrigault *et al.*, 2009). De plus, une activité d'agglutination de champignons a été montrée en présence de AiC1qDC-1, une protéine C1q-DC caractérisée chez *A. irradians* (Kong *et al.*, 2010). Chez *M. galloprovincialis*, les transcrits de MgC1q sont abondants dans les hémocytes et augmentent rapidement et fortement en réponse à l'injection de bactéries, qu'elles soient Gram-positives ou Gram-négatives (Gestal *et al.*, 2010).

C.3 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des peptides cationiques de défense de l'hôte, présentant une grande diversité structurale. Dans la plupart des cas, ce sont toutefois de petits peptides, de 20 à 50 acides aminés, avec au moins deux charges positives (résidus arginine ou lysine) et une portion substantielle ($\geq 50\%$) de résidus hydrophobes (Powers et Hancock, 2003). Ces peptides possèdent la capacité d'adopter une conformation amphipathique avec des complexes hydrophobes opposés et chargés positivement quand ils font face aux membranes bactériennes (Papo et Shai, 2003). Grâce à cette propriété amphipathique, les AMPs peuvent être véhiculés par l'hémolymph et interagir directement avec les bactéries envahissantes en causant la lyse de leur paroi (Hancock et Rozek, 2002 ; Powers et Hancock, 2003). Les différents peptides sont aussi engagés dans la destruction des bactéries à l'intérieur du phagocyte, avant d'être relâchés dans l'hémolymph pour participer aux réponses systémiques (Mitta *et al.*, 2000a, b). En plus de leurs activités antimicrobiennes, les AMPs sont impliqués dans d'autres fonctions telles que des fonctions pro- ou anti- inflammatoires, de stimulation des guérisons de blessures, et d'activité anti-tumorale des cellules (Brown et Hancock, 2006).

Les peptides antimicrobiens des bivalves sont synthétisés dans les hémocytes circulants granulaires, sous forme de précurseurs et stockés dans les granules (Mitta *et al.*, 2000b). Une expression basale constante était considérée (Bachère *et al.*, 2004 ; Mitta *et al.*, 2000b) mais de récentes études ont indiqué que celle-ci peut être induite par des expositions bactérienne (Cellura *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2007 ; Guéguen *et al.*, 2009). Les concentrations en AMPs les plus importantes sont, la plupart du temps, mesurées dans les voies digestives et les organes respiratoires qui sont les plus exposés aux microorganismes (Tincu et Taylor, 2004).

Les séquences peptidiques des AMPs des moules sont caractérisées par leur richesse en cystéines. Quatre groupes d'AMP sont distingués selon leur structure primaire et les séquences consensus de cystéine: les défensines (6 cystéines), les mytilines (8 cystéines), les myticines (8 cystéines) et les mytimicines (12 cystéines) (Mitta *et al.*, 2000b).

Deux isoformes de défensines, A et B, ont été isolées du plasma des moules bleues *M. edulis* (Mitta *et al.*, 2000b). Chez la moule *M. galloprovincialis*, on distingue deux MGD (pour *Mytilus Galloprovincialis Defensin*) : MGD-1 et MGD-2, respectivement purifiées à partir du plasma et/ou des hémocytes. Trois nouvelles séquences, MGD-3, MGD-4 et MGD-5 ont récemment été décrites à partir des hémocytes de *M. galloprovincialis* (Venier *et al.*, 2011). Cinq isoformes de mytiline ont été répertoriées : les isoformes A et B ont été isolées à partir du plasma de *M. edulis*, et les isoformes B, C, D et G1 ont été purifiées à partir des hémocytes de *M. galloprovincialis*. Récemment, Venier *et al.* (2011) ont identifié une sixième isoforme, la mytiline F. Des isoformes baptisées A, B et C des myticines ont aussi été décrites ; la forme A a été isolée chez *M. galloprovincialis* des hémocytes et du plasma, les formes B et C uniquement des hémocytes chez la même espèce (Mitta *et al.*, 1999b ; Pallavicini *et al.*, 2008). Enfin, les mytimicines ont été caractérisées à partir du plasma de *M. edulis* (Mitta *et al.*, 2000b) (Tableau 2).

Tableau 2 : Récapitulatifs des peptides antimicrobiens retrouvés chez les moules (+ représente les activités, nr=non renseigné)

		Isolés de :		Nombre de cystéines	Activité contre :			Références	
Groupe	Isoforme	Espèce	Tissus		Bactéries		Champignons		
					Gram-positives	Gram-négatives			
Défensines	A	<i>M. edulis</i>	plasma	6	+++	+	+	Charlet <i>et al.</i> , 1996	
	B								
	MGD1	<i>M. galloprovincialis</i>	plasma et hémocytes	8					
	MGD2		hémocytes			Mitta <i>et al.</i> , 1999a			
	MGD3			8	nr			Venier <i>et al.</i> , 2011	
	MGD4								
	MGD5								
Mytilines	A	<i>M. edulis</i>	plasma	8	+	+	nr	Charlet <i>et al.</i> , 1996	
	B					++	Mitta <i>et al.</i> , 2000		
	B	<i>M. galloprovincialis</i>	hémocytes		+++	+++		+++	
	C							nr	
	D							non	nr
	G1							nr	nr
	F								
Myticines	A	<i>M. galloprovincialis</i>	plasma et hémocytes	8	+++	+	nr	Mitta <i>et al.</i> , 1999b	
	B		hémocytes		+++	+++	nr	Pallavacini <i>et al.</i> , 2008	
	C								
Mytimicines		<i>M. edulis</i>	plasma	12	non	non	+++	Charlet <i>et al.</i> , 1996	

Les AMPs des moules possèdent des activités antimicrobiennes spécifiques et complémentaires. Les défensines et les myticines sont plus actives contre les bactéries Gram-positives que contre les Gram-négatives et les champignons. Les mytimicines sont exclusivement antifongiques. Les mytilines B, C et D sont actives contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, incluant les vibrios, alors que G1 est seulement active contre les Gram-positives (Mitta *et al.*, 2000b ;

Tincu et Taylor, 2004) (*Tableau 2*). La plupart des granulocytes expriment uniquement un seul type de peptide antimicrobien et leur attribution dans les différents organes de l'hôte semble être dictée par le type de peptide produit. Par exemple, les granulocytes exprimant les défensines sont concentrés dans l'épithélium intestinal, alors que les granulocytes exprimant les mytilines et les myticines sont bien représentés dans les branchies. Les défensines sont impliquées dans les défenses extracellulaires alors que les mytilines agissent à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire (Mitta *et al.*, 2000a).

Les transcrits de myticine C présentent un inhabituel et haut niveau de polymorphisme d'importance biologique non identifiée (Costa *et al.*, 2009a). Une récente étude *in vivo* et *in vitro* sur des hémocytes de *M. galloprovincialis* a montré qu'une surexpression de la myticine C est capable d'altérer l'expression de certains gènes immunitaires comme ceux codants pour la myticine B, la mytiline B, la C1qDC et le lysozyme suggérant que la myticine C pourrait agir en tant que molécule modulatrice du système immunitaire. Elle a, de plus, des propriétés antimicrobiennes et chimiotactiques (Balseiro *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que la myticine C pourrait être considérée, non seulement comme un AMP, mais aussi comme la première molécule « chemokine/cytokine-like » identifiée chez les bivalves (Balseiro *et al.*, 2011).

Des activités antimicrobiennes ont également été observées chez les huîtres grâce à deux AMPs appartenant à la famille des défensines: les défensines AOD (pour « *American Oyster Defensin* ») isolées à partir des branchies des huîtres *C. virginica* et les Cg-Def du manteau des huîtres *C. gigas* (Seo *et al.*, 2005 ; Guéguen *et al.*, 2006). Les défensines AOD sont actives contre les bactéries Gram-positives comme *Escherichia coli* et *V. parahaemolyticus* alors que le pouvoir antimicrobien de Cg-Def est faible voir nul contre les bactéries Gram-négatives et les champignons comme la plupart des défensines des invertébrés (Seo *et al.*, 2005 ; Guéguen *et al.*, 2006).

C.4 Les enzymes hydrolytiques

Les cellules eucaryotes possèdent des organites cellulaires liés aux membranes appelés les lysosomes qui contiennent différentes enzymes hydrolytiques acide-dépendantes (Dell'Angelica *et al.*, 2000). Chez les bivalves, les lysosomes sont nombreux dans les hémocytes granulaires (Cheng, 1983 ; Pipe, 1990b). La β -glucoronidase, les phosphatases alcalines et acides, le lysozyme, des lipases et des estérases non spécifiques représentent des enzymes détectées chez différents bivalves (Cheng et Rodrick, 1975 ; Carballal *et al.*, 1997 ; Xing *et al.*, 2002) incluant *M. edulis* (Carballal *et al.*, 1997 ; Olsen *et al.*, 2003). Pendant l'infection, ces enzymes sont libérées dans l'hémolymph pour neutraliser les microorganismes envahissants (Cheng, 1983). Les enzymes lysosomales, spécialement le lysozyme, sont parmi les protéines impliquées dans le système immunitaire des invertébrés les plus étudiées.

- Le lysozyme

Le lysozyme est une enzyme antibactérienne omniprésente retrouvée dans des organismes variés tels que les bactéries, les bactériophages, les champignons, les plantes et les animaux. Il joue un rôle dans la digestion et dans les défenses de l'hôte et ses fonctions ont été associées avec sa localisation tissulaire ainsi que son activité antimicrobienne (Olsen *et al.*, 2003 ; Xue *et al.*, 2004, 2007 ; Itoh *et al.*, 2007). Le lysozyme digestif est trouvé dans le stylet cristallin et dans la masse viscérale (McHenery *et al.*, 1979), alors que le lysozyme de défense de l'hôte est trouvé dans l'hémolymph (hémocytes et plasma), dans les fluides extrapalléaux, dans les palpes labiaux et dans le manteau (McHenery *et al.*, 1979 ; Allam *et al.*, 2000 ; Itoh *et al.*, 2007). Ce dernier est actif contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Nilsen *et al.*, 1999 ; Xue *et al.*, 2004). En effet, le lysozyme est caractérisé par sa capacité à hydrolyser les liaisons glycosidiques des sucres de la paroi constituée essentiellement de peptidoglycanes, principaux composants des bactéries Gram-positives, et de la chitine (Jollès et Jollès, 1984). Quant aux bactéries Gram-négatives, elles peuvent être hydrolysées par le lysozyme grâce à un mécanisme similaire à celui des peptides antimicrobiens. Par exemple, le lysozyme purifié de l'hémolymph de *C. virginica*

inhibe la croissance des bactéries Gram-positives (*Lactococcus garvieae*, *Enterococcus sp.*) aussi bien que celles des Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*) (Xue *et al.*, 2004). Par ailleurs, le lysozyme peut agir comme une opsonine non spécifique innée en se fixant à la surface bactérienne, réduisant ainsi la charge négative et facilitant la phagocytose de la bactérie. Des activités anti-protozoaires et anti-fongiques ont aussi été observées pour le lysozyme (Bierman *et al.*, 1979 ; Samaranayake *et al.*, 1997).

Différents types de lysozyme existent et sont classés selon des critères de structure des domaines catalytiques et de motifs antigéniques. Le lysozyme de type C, initialement isolé chez le poulet, a été observé chez les autres oiseaux, les mammifères, les reptiles et les insectes. Le lysozyme de type G a été purifié chez des oies et d'autres oiseaux (Jollès et Jollès, 1984). Le lysozyme de type I a été trouvé chez les invertébrés, incluant les mollusques bivalves, certains crustacés et les insectes (Bachali *et al.*, 2002). Il a notamment été identifié chez les moules *M. edulis* (Olsen *et al.*, 2003) et *M. galloprovincialis* (Bachali *et al.*, 2002), les huîtres *C. gigas*, *Ostrea edulis* (Matsumoto *et al.*, 2006) et *C. virginica* (Xue *et al.*, 2004), les pétoncles *Chlamys islandican* (Nilsen *et al.*, 1999) et *C. opercularis* (McHenery *et al.*, 1979), et les myes *M. arenaria* (Cheng et Rodrick, 1974 ; Rodrick, 1979 ; McHenery *et al.*, 1979 ; Mateo *et al.*, 2010).

Dans la « Mytibase » de *M. galloprovincialis*, 8 transcrits codant pour le lysozyme peuvent être classés en types C et G, dont un est similaire au lysozyme de type C décrit chez les insectes mais pas encore retrouvé chez les mollusques (Venier *et al.*, 2011). De plus, chez *M. edulis*, trois types de lysozyme impliqués dans la digestion (lysosymes sA, sB, et sC) et un enzyme impliqué dans les défenses de l'hôte (le lysozyme bm) sont répertoriés (Olsen *et al.*, 2003). Chez *C. virginica*, deux types de lysozyme ont été décrits ; on distingue le cv-lysozyme 1 trouvé dans les palpes labiaux, le manteau et les branchies et le cv-lysozyme 2 présent dans les tubules digestifs (Itoh *et al.*, 2007 ; Xue *et al.*, 2007). Chez *C. gigas*, deux types de lysozyme, CGL-1 et 2 ont été identifiés dans les tubules digestifs (Itoh et Takahashi, 2007).

Une augmentation du niveau de l'activité lysozyme a été décrite pendant des « challenges » expérimentaux avec des pathogènes chez des espèces telles que les palourdes *R. phillipinarum* et *R. decussatus* infectées par *V. tapetis* et *V. anguillarum* (Allam *et al.*, 2000, 2006) et les moules *M. galloprovincialis* infectées avec *V. splendidus*, *V. anguillarum* et *M. lysodeiktycus* (Ciacci *et al.*, 2009). De plus, le lysozyme a été détecté dans le plasma et dans les hémocytes de plusieurs bivalves en différentes proportions. Par exemple, des activités catalytiques de type lysozyme sont plus élevées dans les hémocytes par comparaison au plasma des moules *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997) ou des huîtres *O. edulis* (Cronin *et al.*, 2001). Au contraire, chez les huîtres *C. virginica*, de plus hauts niveaux d'activité lysozyme sont mesurés dans le plasma par rapport aux hémocytes (Chen et Rodrick, 1975).

C.5 Les protéines de chocs thermiques (HSPs)

Les protéines de chocs thermiques (HSPs pour *Heat Shock Proteins*) sont des protéines conservées phylogénétiquement et présentes chez les procaryotes et les eucaryotes (Feder et Hofmann, 1999 ; Pockley, 2003 ; Tsan et Gao, 2004 ; Multhoff, 2006). Ces protéines chaperons ont pour rôle la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées (Multhoff, 2006). Dans des conditions de stress, les HSPs sont exprimées pour stabiliser et replier partiellement les protéines dénaturées ou servir d'intermédiaire dans la dégradation des protéines endommagées (Feder et Hofmann, 1999 ; Zügel et Kaufmann, 1999 ; Wallin *et al.*, 2002 ; Routsias et Tzioufas, 2006).

Les HSPs sont libérées dans l'environnement extracellulaire lors de la nécrose cellulaire (Tsan et Gao, 2004) ou peuvent être sécrétées (Ireland *et al.*, 2007). Chez les vertébrés, elles jouent un rôle important dans les mécanismes d'activation des réponses immunitaires incluant les voies de signalisation cellulaire impliquant le CD14, les récepteurs Toll de type 2 et 4 (TLR-2 et TLR-4) ainsi que lors de la présentation des antigènes (Routsias et Tzioufas, 2006 ; Wallin *et al.*, 2002).

Le stress impliquant l'induction des HSPs peut être dû à des facteurs pathologiques tels que les infections, physiologiques tels que la différenciation de cellules, ou encore environnementaux comme la température, mais aussi l'exposition aux stress oxydants, l'irradiation par les ultraviolets, les métaux lourds et les produits chimiques (Moseley, 1997 ; Pockley, 2003 ; Tsan et Gao, 2004). En effet, une augmentation des niveaux d'expression des gènes codants pour les HSPs chez les huîtres *C. gigas* et les moules *M. galloprovincialis* a été montrée après un stress thermique et l'exposition à des métaux lourds (Boutet *et al.*, 2003 ; Piano *et al.*, 2004 ; Franzellitti et Fabri, 2005). Les infections par des pathogènes induisent aussi l'expression des HSPs chez les bivalves. Par exemple, chez *Argopecten irradians*, l'expression du gène codant pour les Hsp70 est induite après exposition à *V. anguillarum* (Song *et al.*, 2006). Il en est de même chez la moule *M. galloprovincialis* où l'expression des Hsp70 est induite par *V. anguillarum* (Cellura *et al.*, 2006 ; 2007).

C.6 Le système prophénoloxydase

Le système prophénoloxydase (proPO) est une cascade d'activation de molécules menant à une mélanisation des tissus et des pathogènes. Pendant la formation de mélanine, l'oxydation des phénols permet la production de quinones toxiques grâce à des phénoloxydases (Cerenius et Söderhäll, 2004). Le système est activé par des protéases à sérine en présence de composants bactériens ou fongiques tels que les β -glycanes, les peptidoglycanes et les LPS et est régulé par des protéases inhibitrices. L'activation subséquente des protéases à sérine entraîne un clivage des pro-prophénoloxydases (pro-ppA) stimulant les prophénoloxydases (ppA), catalysant alors un clivage des proPO pour activer les phénoloxydases (Cerenius et Söderhäll, 2004) (*Figure 7*).

Les phénoloxydases (POs) forment un groupe de protéines à cuivre incluant les tyrosinases, catécholases et laccases. Chez plusieurs insectes et crustacés, des substances antimicrobiennes sont produites grâce à la cascade du système PO et participent directement à l'élimination des microorganismes envahissants (Luna-Acosta *et al.*, 2011).

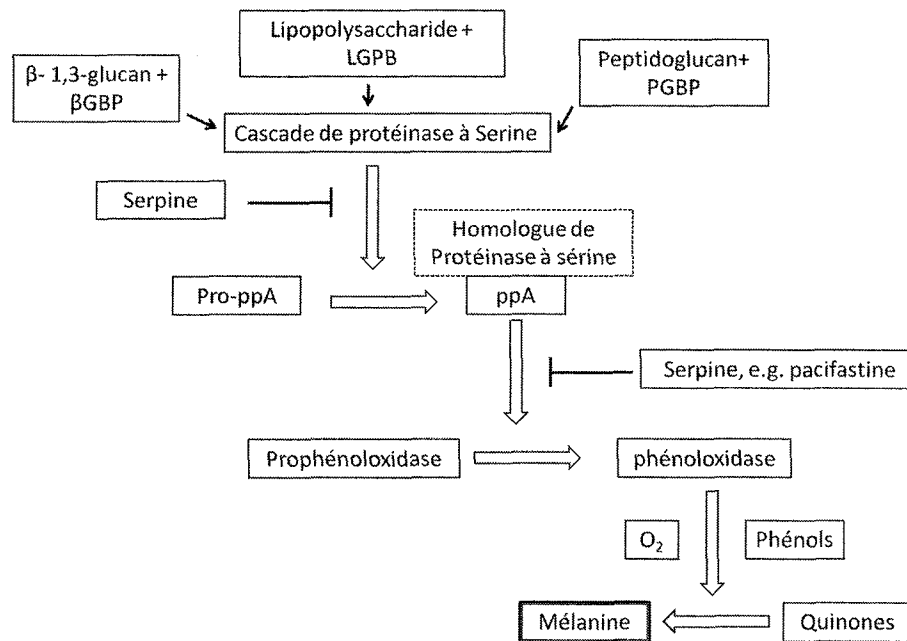


Figure 7 : vue d'ensemble du système d'activation prophénoloxidase des arthropodes (proPO)
(Source : Cerenius et Söderhäll, 2004).

Cette cascade défensive est commune chez les crustacés et l'enzyme phénoloxidase a également été identifiée dans l'hémolymphe des mollusques bivalves tels que les moules *M. edulis* (Coles et Pipe, 1994) et *Perna viridis* (Asokan *et al.*, 1997), les huîtres *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007b, c) et *C. gigas* (Luna-Gonzales *et al.*, 2003 ; Hellio *et al.*, 2007), les myes *M. arenaria* (Smith et Söderhäll, 1991), les palourdes *R. philippinarum* (Cong *et al.*, 2005 ; Muñoz *et al.*, 2006) et les pétoncles *Argopecten ventricosus* (Luna-Gonzales *et al.*, 2003). Comme pour les arthropodes, les proPO sont induites par des PAMPs, tels que les LPS et des protéases exogènes, chez les bivalves dont les moules *Perna viridis* (Asokan *et al.*, 1997), les coquilles Saint-Jacques *N. subnodosus*, les huîtres *C. gigas* (Luna-Gonzales *et al.*, 2003) et *S. glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007b,c). Cependant, chez les myes *M. arenaria* et les moules *M. edulis*, les proPO ne sont pas activées par des protéases (Smith et Söderhäll, 1991).

De plus, une étude a récemment montré des activités antimicrobiennes, par inhibition de la croissance de *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041, de lysats d'hémocytes de *C. gigas*

impliquant les phénoloxydases, et plus particulièrement les réactions catalytiques de laccases (Luna-Acosta *et al.*, 2011). D'autres auteurs ont montré que, en utilisant la dopamine comme substrat, des produits de réactions des phénoloxydases purifiées à partir des hémocytes de *Chlamys farreri* possèdent la capacité à inhiber la croissance de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *Aeromonas salmonicida* (Xing *et al.*, 2012).

C.7 Les produits oxydatifs

Chez plusieurs espèces, la production de composés oxydatifs par les cellules peut être activée par des particules étrangères. Ce type de mécanisme de défense se réfère au « stress oxydant ou stress oxydatif ». Le stress oxydant résulte de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) et d'espèces réactives azotées (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*) oxydantes (Torreilles *et al.*, 1996 ; Buggé *et al.*, 2007). La voie des oxydases à NADPH et celle des synthétases NO mènent à la production des ROS et des RNS, respectivement (Dröge, 2002). Pour les ROS, le métabolite initial, l'anion superoxyde (O_2^-) est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut ensuite être converti en d'autres ROS toxiques, telles que le radical hydroxyle (OH^\cdot) ou le dioxygène singulet (1O_2). Pour les RNS, NO^\cdot est oxydé par la NO^\cdot synthétase et, bien que sa formation semble être indépendante des ROS, ses interactions avec l'anion superoxyde O_2^- mènent à la formation de peroxydinitrite ($ONOO^\cdot$), un composant plus toxique que ses précurseurs (Spettstoesser et Schuff-Werner, 2002). L'intervention de ces radicaux oxygénés toxiques, aussi appelé « flambée oxydative » joue un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (bactéries, virus, levures, et protozoaires). L'attachement de particules étrangères sur la membrane plasmique des hémocytes active la NADPH oxydase membranaire qui va catalyser la production de ces métabolites.

L'activité du stress oxydant a été documentée chez plusieurs espèces de bivalves incluant les palourdes *R. decussatus* (Tafalla *et al.*, 2003), les coquilles Saint-Jacques (*P. maximus*), les huîtres (*C. virginica* et *C. gigas*) (Villamil *et al.*, 2007) et les moules *M. galloprovincialis* (Ottaviani *et al.*, 1993 ; Arumugam *et al.*, 2000 ; Tafalla *et al.*, 2002) et *M. edulis* (Akaishi *et al.*,

2007). Seulement quelques études ont décrit la production d'oxyde nitrique par les hémocytes de mollusques. Notamment, la production de NO⁻ induite suite à l'addition de LPS d'*E. coli* à des hémocytes de *M. edulis* entraîne un rassemblement bactérien accru autour de ces cellules immunitaires. Ce groupement bactérien est réduit par l'addition d'inhibiteurs de synthétase NO⁻, suggérant qu'il est causé par la libération de NO⁻ par les cellules (Ottaviani *et al.*, 1993). La production de NO⁻ est induite par des challenges de *M. galloprovincialis* avec *Micrococcus lysodeikticus* et *V. anguillarum* (Costa *et al.*, 2009a).

Chez la plupart des organismes aérobies, la génération des ROS est une conséquence inévitable du métabolisme. Une concentration appropriée des ROS peut constituer le signal de déclenchement de voies de signalisation, étant de ce fait bénéfique pour les réponses de l'organisme contre les pathogènes envahissants (Schreck *et al.*, 1991 ; Galloway et Depledge, 2001). Cependant, les espèces marines font souvent face à des infections par des pathogènes, à des pollutions par des métaux lourds et à des températures variables. Toutes ces conditions peuvent entraîner la production de ROS et augmenter le stress oxydant chez ces organismes (Yu *et al.*, 2011). Or, une production excessive de radicaux toxiques peut mener à plusieurs effets négatifs tels que la peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN, une perte des fonctions cellulaires, et finalement l'apoptose ou la nécrose (De Zoysa *et al.*, 2011). Pour se protéger contre les dommages causés par ces radicaux toxiques, les organismes utilisent des systèmes enzymatiques antioxydants comme la superoxyde dismutase (SOD), des catalases, le glutathion peroxydase, la thioredoxine réductase et les glutathion S-transférases afin d'éliminer ces radicaux libres et catalyser leur conversion en composés moins toxiques (Yu *et al.*, 2011).

Chez *M. galloprovincialis*, des séquences codantes partielles ou complètes de la SOD, de la catalase, du glutathion transférase, de la thiolase peroxysomale et de l'oxydase polyamine ont été décrites (Hoarau *et al.*, 2006 ; Dondero *et al.*, 2006 ; Kolaiti *et al.*, 2009 ; Bilbao *et al.*, 2009). Dans la base de données nucléiques, Mytibase, de nombreux transcrits codant pour des enzymes comme la SOD, le glutathion peroxydase, des amines oxydase, des déshydrogénases, des peroxydases, des oxydases réductases sont également répertoriés (Venier *et al.*, 2011).

Généralement, les niveaux de messagers codant pour les enzymes anti-oxydantes sont augmentés en conditions de stress (Yu *et al.*, 2011). Par exemple, une augmentation des niveaux de transcrits de SOD a été décrite chez *C. gigas* et *Haliotis discus discus* après un stress thermique et un stress induit par les métaux (Kim *et al.*, 2007 ; Boutet *et al.*, 2004). Cependant, une sous régulation de la SOD a été observée chez *C. gigas* en réponse à *V. aestuarianus* alors que les radicaux toxiques étaient augmentés (Labreuche *et al.*, 2006a, b).

C.8 Les inhibiteurs de protéases

Les fonctions des inhibiteurs de protéases sont essentielles pour tout organisme vivant. D'une part, ils préviennent une activité protéolytique incontrôlée et, d'autre part, ils protègent l'organisme d'une activité protéolytique exogène, qu'elle soit le fait de prédateurs ou d'organismes pathogènes (Deraison Manuel, 2002). Les protéases font l'objet d'une régulation très étroite, limitant ainsi leur activité catalytique aux seuls processus et compartiments physiologiques où elles sont nécessaires. Classiquement, quatre classes d'inhibiteurs de protéases sont distinguées. Elles inhibent respectivement chacun des groupes majeurs de protéases qui sont définis en fonction des acides aminés clés de leurs sites catalytiques. Les **protéases à sérine** comportent généralement dans leur site actif une sérine, une histidine et un aspartate formant la triade catalytique. Les **protéases à cystéine**, largement représentées, sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra et extracellulaires. Leur triade catalytique est formée de trois résidus (cystéine, histidine et asparagine), le résidu cystéine constituant le groupement nucléophile. Les **protéases acides** et les **métalloprotéases** agissent par l'intermédiaire d'une molécule d'eau activée, cette dernière constitue l'agent nucléophile permettant d'attaquer la liaison peptidique. Les résidus impliqués dans la catalyse sont deux résidus acides, aspartatyl ou glutamyl, qui jouent le rôle de ligand de la molécule d'eau activée pour les protéases acides, alors que dans le cas des métalloprotéases, la molécule d'eau est liée à un ou deux ions métalliques, généralement du zinc (Deraison Manuel, 2002).

Les mécanismes d'action des inhibiteurs de protéases sont variés, ils peuvent aller d'un blocage du site actif par une autre protéine qui séquestre la protéase, à l'inactivation irréversible de résidus du site actif par un composé chimique (inhibiteur suicide), en passant par des analogues de peptides qui miment le substrat naturel.

Chez les bivalves, la fonction des inhibiteurs de protéase dans la réponse immunitaire a été explorée. A titre d'exemple, les protéines inhibitrices des protéases à sérine ont été identifiées chez les pétoncles *A. irradians* et *C. farreri* (Zhu *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008). Les protéases inhibitrices de la phase humorale sont principalement représentées par les **α_2 -macroglobulines** alors que celles des tissus sont pour la plupart représentées par les **inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs)** (Brew *et al.*, 2000).

La toxicité de *V. splendidus* est corrélée avec la présence de métalloprotéinase (ou métalloprotéase) et de son gène *vsm* correspondant (Binesse *et al.*, 2008). En effet, la métalloprotéinase *vsm* purifiée est létale pour les bivalves, notamment les huîtres. De plus, elle est à l'origine d'altération de la morphologie de cellules issues d'une lignée cellulaire de souris et entraîne un détachement de la matrice extracellulaire (Binesse *et al.*, 2008). Les inhibiteurs de métalloprotéinases produits par des bivalves peuvent jouer un rôle important lors d'infection avec *V. splendidus*.

- Les α_2 -macroglobulines

Les α_2 -macroglobulines (α_2 -Ms) sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire trouvées dans le plasma des vertébrés et des invertébrés. Elles modulent la réponse immunitaire en piégeant les protéases en excès et en formant des complexes qui, en conséquence, exposent des domaines de récepteur précédemment indisponibles. Ces sites sont reconnus et liés par les récepteurs aux macrophages et à d'autres cellules phagocytaires entraînant la libération des protéases (Sottrup-Jensen, 1989).

Les α_2 -Ms agissent comme protéines inhibitrices des métalloprotéinases bactériennes et des protéases à sérines des protozoaires (Faisal *et al.*, 1998). Pour ce qui concerne les bivalves, les

alpha₂-Ms ont été identifiées chez la palourde *Spisula solidissima* (Armstrong et Quigley, 1992), les huîtres *C. virginica* et *C. gigas* (Faisal *et al.*, 1998), et la mye *Mya arenaria* (Elsayed *et al.*, 1999).

- Les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs)

Les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs) sont d'anciennes protéines eucaryotes trouvées chez les humains, les oiseaux, les amphibiens, les poissons, les insectes (Brew *et al.*, 2000) et d'autres invertébrés, incluant les bivalves (Montagnani *et al.*, 2001). Les TIMPs interviennent dans l'homéostasie du métabolisme de la matrice extracellulaire (Brew *et al.*, 2000). L'expression des TIMPs est régulée pendant la reconstruction des tissus et dans les conditions physiologiques propres à chaque espèce (Brew *et al.*, 2000). De plus, les TIMPs sont impliqués dans les mécanismes de défense et leur expression peut être régulée en réponse à l'invasion d'un pathogène (Montagnani *et al.*, 2001). Par exemple, chez les huîtres *C. gigas*, l'expression des gènes codant pour les TIMPs est induite par des dommages de la coquille et par des challenges bactériens avec un mélange de *V. anguillarum*, *V. metshnikohii* et *Vibrio S322* (Montagnani *et al.*, 2001, 2007) mais pas avec *V. aestuarianus* (Labreuche *et al.*, 2006b).

C.9 Les cytokines

Les cytokines, incluant les interleukines (IL-), les interférons (IF) et les chimiokines, sont reconnues comme les molécules de régulation dans les mécanismes de défense de l'hôte et de l'homéostasie des vertébrés (Cohen et Cohen, 1996). Ce sont des substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire. Chez les invertébrés, il a été montré que les cytokines sont impliquées dans les fonctions incluant la mobilité des cellules, le chimiotactisme, la phagocytose et la cytotoxicité, similairement aux vertébrés (Ottaviani *et al.*, 2003).

Des protéines homologues aux cytokines des vertébrés et à leurs récepteurs ont été identifiées chez des bivalves. Par exemple, les facteurs de croissance tels que le facteur de nécrose tumorale

TNF- α (pour *Tumor Necrosis Factor*) induits par les lipopolysaccharides sont retrouvés dans les hémocytes et les tissus des pétoncles *C. farreri* (Yu *et al.*, 2007) et des huîtres *C. gigas* (Park *et al.*, 2008). Pour les interleukines, un homologue de l'IL-17 a été trouvé dans les hémocytes chez *C. gigas* et son expression est stimulée par un mélange bactérien de *M. luteus*, *V. splendidus* et *V. anguillarum* (Roberts *et al.*, 2008). De plus, des sous-unités α , β et γ du récepteur de l'IL-2R ont été identifiées chez les moules *M. galloprovincialis* où la synthèse de l'IL-1 α est régulée par les LPS (Barcia *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2003). En outre, les hémocytes des moules *M. edulis* peuvent être stimulés par les LPS induisant ainsi la production des cytokines IL-1 et TNF (Hughes *et al.*, 1991).

Les cytokines recombinantes, c'est-à-dire les cytokines produites à partir de l'expression d'un vecteur de clonage contenant le gène désiré de cytokine, peuvent activer les hémocytes des bivalves. Par exemple, chez *M. edulis*, les IL-1 humaines recombinantes induisent la production de TNF (Hughes *et al.*, 1990). L'activité phagocytaire des hémocytes de *M. galloprovincialis* est stimulée lors d'une activation par le TNF- α (Betti *et al.*, 2006). De plus, chez les huîtres *Pinctada fucata*, l'interféron- ω de félin recombinante réduit la mortalité et augmente les fonctions réparatrices des tissus à la suite d'une infection virale (Miyazaki *et al.*, 2000).

D- Interactions Bivalves-Bactéries

Du fait de leurs caractéristiques anatomiques et physiologiques, les mollusques bivalves sont en contact intime avec les microorganismes qui cohabitent dans l'environnement. La zone intertidale est un milieu renfermant une grande variété de microorganismes, parmi lesquels des bactéries pathogènes et non-pathogènes, qui peuvent être filtrées et accumulées par les organismes filtreurs (Jones *et al.*, 1991 ; Pruzzo *et al.*, 2005). Ainsi, les tissus et l'hémolymphe des organismes hôtes sont constamment exposés aux bactéries. Pendant ces rencontres, une série de molécules de l'hôte

et des bactéries interagissent entre elles et activent les mécanismes menant, respectivement, à un contrôle des infections potentielles et à la survie des bivalves dans cet environnement hostile.

D.1 Les mécanismes de défense des bivalves lors d'une infection bactérienne

- Au niveau cellulaire

Dans le but de contrôler l'infection, tous les composants cellulaires éliminent directement les bactéries envahissantes ou leurs composants et/ou stimulent d'autres hémocytes pour activer les mécanismes de défense de l'hôte. L'activité cytotoxique des hémocytes des invertébrés requiert des contacts proches avec les cellules cibles : le premier niveau de la reconnaissance du « non-soi » et de l'élimination de corps étrangers est présent chez tous les invertébrés à travers la phagocytose (*Figure 8*).

Tout d'abord, les hémocytes des bivalves manifestent des migrations chimiotactiques et chimiocinétiques vers les composants bactériens (Schneezeiss et Renwranz, 1993). L'adhésion des bactéries à la membrane des phagocytes ne dépend pas seulement des forces physiques (hydrophobicité et interactions des charges) mais peut aussi se faire par l'intermédiaire de molécules comme les lectines. En effet, les lectines des bivalves sont considérées comme des PRRs (pour *Pattern Recognition Receptors*) (Kang *et al.*, 2006). Après avoir lié les bactéries, les lectines facilitent la phagocytose grâce à des opsonines ou en immobilisant les bactéries par l'intermédiaire d'agglutinines (Olafsen 1995, 1996). Une fois l'adhésion des hémocytes à la bactérie réalisée, la phagocytose est exécutée par une série de processus initiée par une perturbation locale de la membrane plasmique et terminée par l'internalisation (endocytose) de la bactérie à l'intérieur d'une vésicule appelée le phagosome primaire (Robhom, 1984 ; Prieur *et al.*, 1990). Par la suite, différents événements ont lieu dans le but d'éliminer la bactérie. Les lysosomes fusionnent avec le phagosome formant ainsi les phagolysosomes et libèrent les enzymes hydrolytiques telles que les β -glucuronidases, les phosphatases alcalines et acides, le lysozyme, les lipases et des estérases non spécifiques (Chen et Rodrick, 1975 ; Rodrick, 1979 ; Huffman et Tripp, 1982 ; Carballal *et al.*, 1997 ; Xing *et al.*, 2002) (*Figure 8*). Similairement, à

l'intérieur du phagocyte, les peptides antimicrobiens sont sécrétés et acheminés de leurs granules de stockage vers le phagosome. Si l'infection devient systémique, les lysozymes et les peptides antimicrobiens sont relâchés dans le plasma (Cheng, 1983 ; Mitta *et al.*, 1999a ; 2000b ; Canesi *et al.*, 2002 ; Tincu et Taylor, 2004). De plus, l'activation de la cascade des ROS mène à une libération des radicaux libres, tels que les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène (Roch, 1999). Aussi, la lyse hémocytaire conduit à une libération de HSPs constituant un « signal de danger » qui précède les réponses immunitaires (Cellura *et al.*, 2006).

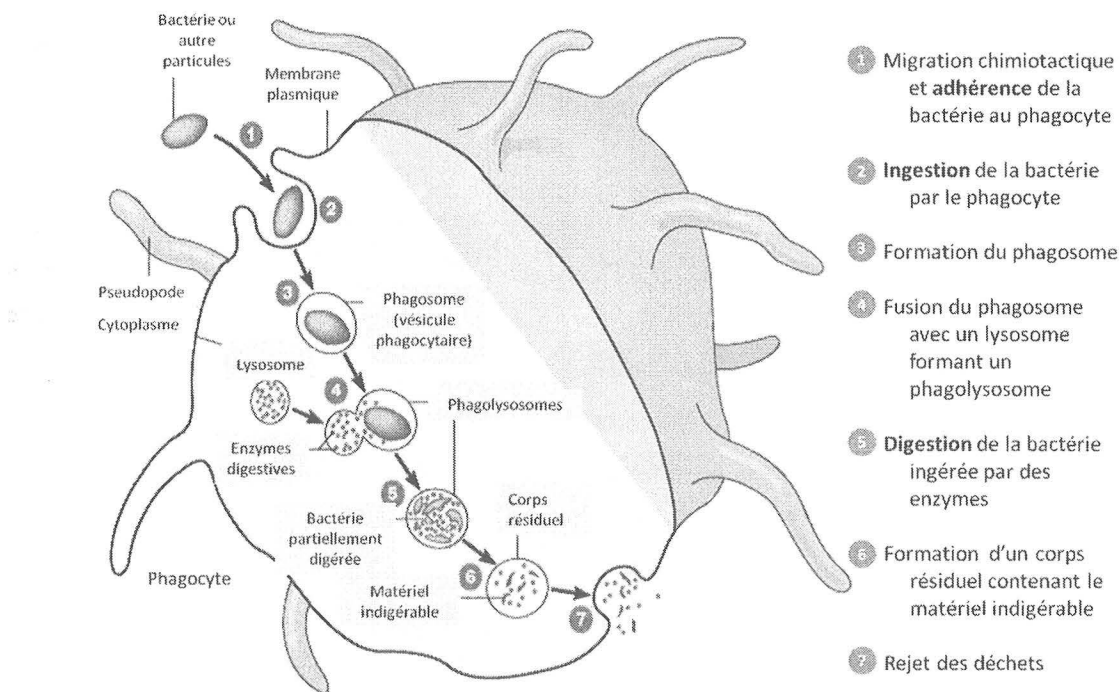


Figure 8 : Les différentes étapes de la phagocytose : adhérence, ingestion et digestion de la bactérie par le phagocyte (Pearson education, 2004).

Des facteurs environnementaux saisonniers tels que la température, la salinité, la nutrition et la gamétogenèse peuvent influencer les processus phagocytaires des hémocytes des bivalves. En effet, *in vitro*, la phagocytose est inhibée à de basses (0 - 5°C) et de hautes températures (37 -

50°C), alors qu'elle est efficace aux températures comprises entre 10 et 37°C en conditions aérobies et anaérobies (Prieur *et al.*, 1990). De plus, Mathieu *et al.* (2003) ont observé une augmentation de l'activité phagocytaire pendant le développement des gonades et une diminution après la reproduction. Il existe donc un lien entre le cycle de reproduction et les activités phagocytaires chez les bivalves (Lemaire *et al.*, 2006).

- Au niveau moléculaire

Les gènes codant pour les protéines impliquées dans les réponses immunitaires sont activés par une infection bactérienne. Des études ont été conduites afin d'identifier les transcrits impliqués dans de tels mécanismes en utilisant des stratégies dites « ouvertes » tels que la technique de SSH (Suppression Subtractive Hybridization). Souvent, une activation des gènes codant pour les AMPs, les protéases et les inhibiteurs de protéases, les cytokines, les récepteurs des réponses aux stress et de traduction du signal de la protéine sont décrites (Huvet *et al.*, 2004 ; Gestal *et al.*, 2007 ; Tanguy *et al.*, 2008 ; Roberts *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). Avec l'émergence des nouvelles techniques de séquençage, le transcriptome est de plus en plus étudié, permettant l'identification de nouveaux transcrits impliqués dans les mécanismes de défense (voir partie I.3).

- Voie de signalisation cellulaire

Les voies de signalisation cellulaire menant à l'activation des réponses immunitaires de l'hôte peuvent être activées lors d'un challenge bactérien. Les récepteurs Toll-like (des homologues des récepteurs Toll de la drosophile), en se liant à leurs ligands, peuvent activer la transduction du signal (Takeda et Akira, 2004). Ces voies de signalisation cellulaire, menant à la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, pourraient impliquer le facteur de transcription NF- κ B (pour *Nuclear Factor κ B*) et la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK pour « *Mitogen-activated protein kinase* ») (Figure 9) (Mogensen, 2009).

La voie de transduction des MAPK est constituée par une famille de kinases à sérines/thréonines impliquées dans divers processus cellulaires incluant la croissance, le cycle cellulaire, le stress et les défenses de l'hôte (Travers *et al.*, 2009). La transduction du signal se fait à travers une cascade de phosphorylation impliquant deux voies principales de signalisation : la voie des JNK (pour *c-jun N-terminal kinases*) et la famille des kinases p38 (Cowan et Storey, 2003). MAPK p38 et JNK activent la transcription du facteur activateur de protéine 1 (AP-1) impliqué dans le contrôle de la synthèse des cytokines inflammatoires (Mogensen, 2009). L'activation des cascades de MAPK et des autres kinases en réponse aux bactéries ou leurs produits ont été identifiés chez les hémocytes des mollusques (Canesi *et al.*, 2002 ; 2005 ; Cao *et al.*, 2004 ; García-García *et al.*, 2008 ; Travers *et al.*, 2009). Dans les hémocytes des moules *M. galloprovincialis*, il a été observé que *Escherichia coli* active principalement les kinases p38 et JNK (Canesi *et al.*, 2002 ; 2005). Chez *M. galloprovincialis*, la voie des phosphatidylinositol-3-hydroxy-kinase (PI-3K) peut être activée par *E. coli* et *V. anguillarum* (Canesi *et al.*, 2002 ; 2005 ; García-García *et al.*, 2008). De plus, les LPS de *E. coli* peuvent provoquer l'activation des protéines kinases A (PKA) et C (PKC), alors que *V. cholerae* « cible » principalement la PKC dans les hémocytes des moules (Cao *et al.*, 2004 ; Canesi *et al.*, 2005).

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans les mécanismes de régulation des gènes codant pour les cytokines et les chimiokines. NF- κ B existe sous forme inactive lorsqu'il est associé à la protéine I κ B (« *Inhibitor κ B* »). En présence de la kinase I κ B (IKK), le complexe NF- κ B/I κ B est dissocié permettant l'activation de NF- κ B (Li et Verma, 2002). Chez les huîtres, il a été démontré que *Vibrio* et les LPS peuvent activer les récepteurs Toll (Qiu *et al.*, 2007) ainsi que I κ B (Green et Barnes, 2009) laissant présager l'implication de cette voie de transduction au niveau des hémocytes chez les mollusques bivalves. Des homologues à NF- κ B et des composants de la voie de transduction ont été trouvés chez les bivalves (Gueguen *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2009). Notamment, un récepteur Toll a été identifié chez les pétoncles *C. farreri* (CfToll-1). L'expression *in vitro* de ce CfToll-1 est différenciellement régulée par différentes concentrations de LPS (Qiu *et al.*, 2007). Aussi, des gènes homologues qui codent pour le récepteur Toll-like 2 (TLR-2) et le récepteur de l'interleukine-1 associé à la kinase 4 (IRAK-4) sont significativement régulés en réponse à des infections *in vivo* par deux souches de

V. splendidus, suggérant un rôle dans l'immunité des hémocytes de *M. arenaria* contre les pathogènes (Mateo *et al.*, 2010). TLR-2 et IRAK-4 appartiennent à la voie de transduction qui mène à l'activation de NF- κ B, suivant l'expression de plusieurs facteurs chez les mammifères (Li *et al.*, 2002).

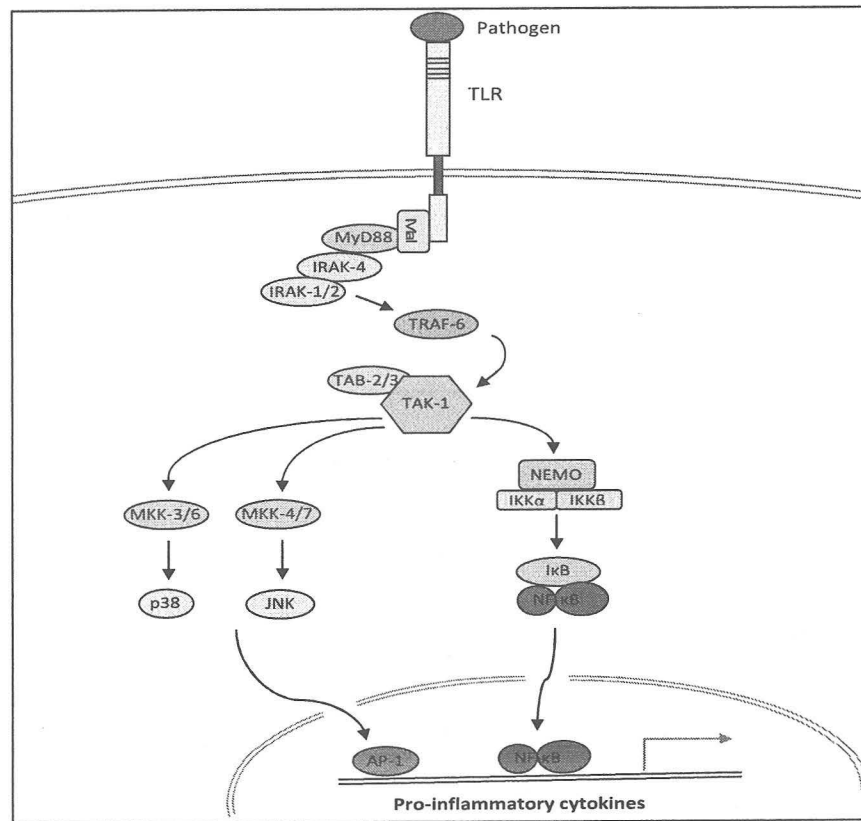


Figure 9 : Principe du signalement par les récepteurs Toll. Après une stimulation par un pathogène, la molécule adaptatrice de MyD88 (Mal pour *MyD88 adaptor-like protein*) et la protéine MyD88 associées avec le TLR (pour *Toll-like receptor*) induisent le recrutement des IRAK (pour *Interleukin-1 receptor-associated kinases*). Après phosphorylation, IRAK-4 et IRAK1/2 s'associent avec le facteur TRAF-6 (pour *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). Ce dernier active le Tak-1 (pour *Transforming growth factor-activated protein kinase-1*) et les kinases I κ B (IKK), sous-unités du NEMO (pour *NF- κ B essential modifier*). Le recrutement subséquent des TAB-2 et 3 (pour *TAK-1-binding protein-2*) pour

l'ubiquitination du TRAF 6, active le signal complexe menant à la stimulation de voies séparées : la voie des NF- κ B (*via* le complexe IKK) et la voie des MAPK. De l'activation d'IKK par TAK-1 résulte la phosphorylation puis la dégradation subséquente de la protéine inhibitrice I κ B. NF- κ B n'est alors plus séquestré dans le cytoplasme et peut être transloqué dans le noyau. Il se lie alors aux sites promoteurs de κ B et entraîne la stimulation de l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires. Dans la voie des MAPK, TAK-1 phosphoryle les MAPK kinases MKK-3/6 et MKK-4/7, qui alors phosphorylent et activent les kinases p38 et JNK (pour *c-jun N-terminal kinases*), respectivement. Ces deux kinases subissent une translocation dans le noyau et activent la transcription du facteur activateur de protéine 1 (AP-1) impliqué dans la synthèse des cytokines inflammatoires (Source : Modifié de Mogensen, 2009).

D.2 Les effets des bactéries sur les hémocytes

Des modifications phénotypiques, fonctionnelles et génotypiques des cellules immunitaires ont été décrites dans plusieurs modèles d'infection bactérienne *in vitro* et *in vivo* chez les mollusques bivalves. Alors que les évaluations des paramètres immunitaires révèlent des défenses efficaces de l'hôte pour contrôler l'infection, d'autres réponses suggèrent l'existence, chez certaines bactéries, de mécanismes d'intervention sur le système immunitaire des bivalves leur permettant de survivre dans l'hôte. En effet, des bactéries, principalement du genre *Vibrio* sont capables de persister à l'intérieur des tissus et des fluides (Murphee et Tamplin, 1995).

- Modifications des caractéristiques hémocytaires

Les infections bactériennes sont habituellement suivies par une **fluctuation dans le nombre d'hémocytes circulants** (Suresh et Mohanda, 1990 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Allam *et al.*, 2001 ; Labreuche *et al.*, 2006b ; Allam *et al.*, 2006 ; Parisi *et al.*, 2008 ; Mateo *et al.*, 2009a). Ces changements dans le nombre peuvent être dus à l'activation de l'hématopoïèse ou à la redistribution des hémocytes circulants à travers les tissus infectés (Bachère *et al.*, 2004).

Quand ils sont en contact avec des surfaces plates, les hémocytes développent des extensions cytoplasmiques pour y adhérer (Labreuche *et al.*, 2006b). A la suite d'une infection bactérienne,

des changements phénotypiques des hémocytes sont documentés chez les bivalves avec, notamment, des changements dans le cytosquelette de l'hôte **produisant des hémocytes ronds et donc une diminution des capacités d'adhérence**. En effet, les pertes de pseudopodes observées pour les hémocytes de divers espèces lors d'un « challenge » avec des bactéries pathogènes, mènent à une réduction des capacités d'adhérence des hémocytes (Lane et Birkbeck, 2000 ; Choquet *et al.*, 2003 ; Allam et Ford, 2006 ; Labreuche *et al.*, 2006a, Araya *et al.*, 2009 ; Mateo *et al.*, 2009a). Par exemple, *Vibrio alginolyticus* et *V. anguillarum* induisent une perte des pseudopodes dans les hémocytes de *M. edulis* (Lane et Birkbeck, 1999). Le cytosquelette apparaît être donc comme affaibli de façon permanente, et les modifications morphologiques observées correspondent probablement à une « stratégie » des bactéries pour échapper au processus de phagocytose. En effet, différentes études ont montré que les expositions bactériennes induisent une diminution des capacités des hémocytes à phagocyter (Allam *et al.*, 2001 ; Allam et Ford, 2006, Labreuche *et al.*, 2006a, b ; Costa *et al.*, 2009a ; Araya *et al.*, 2009). Par exemple, Labreuche *et al.* (2006a) ont montré que les produits extracellulaires de *V. aestuarianus* 01/32 causent la perte des pseudopodes, la réduction de l'adhésion (hémocytes ronds) ainsi que l'activité phagocytaire chez l'huître *C. gigas*. Également, **l'équilibre du système pro/anti-oxydant** dans les hémocytes des bivalves est **modulé** lors d'un challenge bactérien. Par exemple, *V. splendidus* entraîne une diminution de la production des radicaux libres dans les hémocytes de *M. arenaria* (Araya *et al.*, 2009). Cette modulation dépend de l'espèce hôte et du degré pathogène des bactéries (Lambert *et al.*, 1998). Cependant, dans certains cas, cette association n'est pas totalement claire. À titre d'exemple, *V. tapetis*, un pathogène des palourdes qui ne cause pas de signes cliniques ou de mortalité chez les huîtres inhibe le stress oxydatif hémocytaire (production de peroxyde d'hydrogène) chez *C. gigas* (Lambert *et al.*, 2003).

- Infection bactérienne et régulation génique chez l'hôte

Des bactéries possèdent la capacité de réguler l'expression des gènes impliqués dans les processus moléculaires de l'hôte. Selon l'espèce bactérienne ou la souche et l'espèce de l'hôte, l'expression de certains gènes peut être différentiellement modulée. À titre d'exemple,

l'expression des défensines est activée par *V. anguillarum* chez les pétoncles *A. irradians* mais il n'y a pas de modification significative de cette expression chez *M. galloprovincialis* comparée à l'expression des défensines chez les animaux naïfs (Zhao *et al.*, 2007). Aussi, l'expression des Hsp70 dans les hémocytes de *M. galloprovincialis* n'est pas affectée par *V. splendidus* mais est activée par *V. anguillarum* alors que les concentrations en messagers de la mytiline sont diminuées par *V. splendidus* mais augmentées par *V. anguillarum* (Cellura *et al.*, 2007). Également, l'expression des lysozymes chez *M. galloprovincialis* est activée par *V. anguillarum* (Costa *et al.*, 2009a) mais inhibée par *V. splendidus* (Li *et al.*, 2008).

- Perturbation de la signalisation cellulaire par les bactéries

Les bactéries peuvent perturber les voies de signalisation cellulaire grâce à différentes stratégies incluant des modifications de leurs PAMPs tels que les LPS (Mogensen, 2009). Les toxines bactériennes telles que la toxine pertussique des *Bordetella pertussis* et des toxines cholériques de *V. cholerae* sont connues pour inhiber l'activité GTPasique des protéines G par ADP-rybosylation, perturbant ainsi la cascade des MAPK en la stimulant (Gilman, 1995 ; Morris et Malbon, 1999). De plus, il a été montré que *V. cholera* possède une capacité réduite à activer les MAPK dans les hémocytes de *M. galloprovincialis* en comparaison avec *E. coli* (Canesi *et al.*, 2005). Cette activation des MAPK est reliée à la présence de fimbriae et d'hémagglutinines sensibles au mannose (type IV pilus) chez *E. coli* et *V. cholerae*, respectivement. Par ailleurs, une souche pathogène de *V. harveyi* induit un retard par rapport aux souches non pathogènes dans l'activation de la voie des p38-MAPK pour les hémocytes des abalones *Haliotis tuberculata*. Ce retard est associé à une incapacité à induire la production de ROS et l'activité phagocytaire (Travers *et al.*, 2009).

D.3 Les mécanismes par lesquels les bactéries causent leurs effets : les facteurs bactériens de virulence

Pendant le processus d'infection, les bactéries libèrent une série de facteurs de virulence pour perturber les mécanismes de défense hémoducitaire. De telles exotoxines ont été décrites chez différentes espèces de *Vibrio*. Par exemple, chez *V. anguillarum*, une protéase avec des effets cytotoxiques et une toxine ciliostatique ont été identifiées comme des facteurs de virulence contre les larves des huîtres *O. edulis* (Nottage et Birkbeck, 1987). Chez *V. pectenicida* une toxine, connue sous le nom de « *Vibrio hemocyte-killer toxine* » (VHKT), a été identifiée comme létale pour les hémocytes des coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* (Lambert *et al.*, 2001). On peut également citer *Vibrio tapetis* qui possède des facteurs d'adhérence, des hémolysines et synthétise des cytotoxines qui sont libérées afin d'inhiber la formation des pseudopodes et l'adhérence des hémocytes chez les palourdes *Ruditapes philippinarum* (Borrego, 1996). De plus, des sidérophores (agents chélatants du Fe de petite taille sécrétés par les bactéries) ont été identifiés chez les souches de *V. anguillarum* et *V. splendidus* comme capable d'interférer sur la viabilité hémoducitaire chez les palourdes *R. decussatus* (Gómez-León *et al.*, 2005).

Les souches pathogènes de *V. tubiashii* et *V. splendidus*, quant à elles, possèdent des métalloprotéases (*VipA* et *vsm*, respectivement) considérées comme des facteurs virulents pour l'huître *C. gigas* (Le Roux *et al.*, 2007 ; Binesse *et al.*, 2008 ; Hasegawa *et al.*, 2008, 2009). Cependant, des études récentes ont exploré le chemin d'infection et les processus pathogéniques de *V. splendidus* LGP32 et la protéine externe de membrane (OMP pour *outer membrane protein*) OmpU a été montrée être essentielle dans la virulence de LGP32 lors d'infections de l'huître *C. gigas*. OmpU est utilisée comme une adhésine ou une invasine par ce pathogène intracellulaire; elle lui confère des propriétés adhésives et une résistance aux AMPs permettant son entrée et sa survie dans les cellules hôtes (Duperthuy *et al.*, 2010, 2011).

E- Bilan de l'état des connaissances

Pour lutter contre les micro-organismes, les mollusques sont capables de réactions de défenses efficaces, non-spécifiques et dépourvues de mémoire, connues sous le terme d'immunité innée. Les défenses innées impliquent des processus cellulaires et humoraux agissant de façon coordonnée. Elles se rapportent à un ensemble de mécanismes faisant intervenir des molécules de reconnaissance du « non-soi », des voies de signalisation cellulaire, et l'activation de cellules immunocompétentes, les hémocytes. Après l'interaction avec les bactéries, ces cellules sont impliquées dans différents processus dont la phagocytose qui s'accompagne d'une variété de réactions cytotoxiques telle que la production et la libération d'enzymes hydrolytiques, de peptides et protéines à activité antimicrobiennes et l'activation du stress oxydant.

Cependant, les différents mécanismes du fonctionnement du système immunitaire des bivalves en réponse à des agressions extérieures restent encore mal compris. Une des étapes de la compréhension de ces mécanismes pourrait résider dans un déchiffrement du transcriptome afin d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la réponse immunitaire. Grâce à l'émergence des nouvelles techniques de séquençage à haut débit et à la baisse régulière de leurs coûts, les transcriptomes sont de plus en plus étudiés.

I.3 Émergence des technologies: la transcriptomique fonctionnelle

Durant les dernières décennies, le nombre de gènes identifiés a augmenté de manière exponentielle suite au lancement de programme de séquençage. En effet, les séquençages des génomes de nombreux modèles biologiques ont été réalisés. A ce jour, NCBI répertorie 1476 génomes eucaryotes tels que la drosophile *Drosophila melanogaster*, le nématode *Coenorhabditis elegans*, le rat *Rattus norvegicus*, la souris *Mus musculus*, la levure *Saccharomices cerevisiea* et 2892 génomes procaryotes dont celui de plusieurs espèces de *Vibrio*.

Les approches, regroupées sous le terme génomique, visent à exploiter cette connaissance du génome afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus cellulaires. Par exemple, l'expression génique constitue un indicateur sensible et spécifique de la physiologie cellulaire permettant de définir des états sains, pathologiques, ou des situations de stress. En ce sens, l'étude de l'expression génique représente un moyen performant de caractériser les mécanismes d'adaptation des cellules et des organismes aux variations environnementales. De nouvelles technologies sont utilisées pour quantifier les ARN messagers, collectivement appelés transcriptome, présents dans un échantillon biologique (culture cellulaire, tissu ou individu). Bien que les ARN messagers (ARNm) ne constituent qu'une étape de l'expression des gènes, leur abondance est souvent corrélée à l'activité des protéines codées et leur quantification en parallèle est plus aisée à conduire que celle des protéines (Lockhart et Winzeler, 2000). La mesure des niveaux de transcrits suite à l'exposition des hémocytes à des organismes pathogènes peut permettre l'identification des mécanismes de défenses se mettant en place à la suite de l'infection.

A- Concept

La transcriptomique fonctionnelle s'attache à suivre l'évolution des niveaux des ARNm dans une condition donnée comparativement à une situation de référence. La comparaison des profils obtenus permet alors de repérer les gènes plus ou moins exprimés.

Malgré des conceptualisations précoces de l'étude des niveaux de messagers dans le cadre de réseaux, les contraintes techniques ont longtemps restreint les capacités d'investigation. De ce fait, les techniques dérivées du « Northern blot » (Eikhom *et al.*, 1975) ont beaucoup été employées pour la mesure des niveaux de transcrits. Par exemple, pour étudier les réponses immunitaires des organismes, une approche de gènes candidats focalisée sur un seul gène était utilisée. Cependant, les réponses de l'hôte sont le produit de l'expression de multiples gènes et de leurs interactions; cette approche ne permettait donc pas une étude globale du transcriptome.

Cependant, la transcriptomique fonctionnelle a connu une remarquable évolution ces deux dernières décennies. Des nouvelles technologies telles que la SSH et les puces à ADN, qui peuvent scanner un grand nombre de transcrits exprimés à la fois, ont émergé. Plus récemment encore (à partir de 2005), les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS pour *Next Generation Sequencing*) permettent de réaliser du séquençage à très haut débit et de générer des centaines de milliers de fragments simultanément. Ces outils entament la venue des recherches moléculaires en biologie et des études de l'expression des gènes de façon à appréhender de manière précise le transcriptome dans sa globalité. Les défenses immunitaires des mollusques sont encore mal élucidées et ces méthodes peuvent jouer un rôle important dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses hémocytaires suite à une exposition à des bactéries pathogènes.

B- Méthodes d'étude du transcriptome

Deux grandes stratégies d'analyse différentielle existent, l'une est qualifiée de « système ouvert » et l'autre de « gène candidat » (système fermé) (Green *et al.*, 2001). Cette catégorisation repose à la fois sur l'aspect technique et théorique de l'approche. En effet, les systèmes ouverts ne nécessitent aucun pré-requis concernant le génome de l'espèce envisagée et s'appliquent à l'ensemble du transcriptome afin d'en dégager les transcrits différentiellement exprimés ; il n'y a donc pas de limites dues au modèle animal choisi dans leur utilisation. A l'inverse, les méthodologies fermées s'appliquent à un nombre de gènes sélectionnés et préalablement identifiés. Ces techniques requièrent alors une connaissance approfondie des génomes puisque leur application est tributaire des gènes répertoriés chez l'espèce choisie. Les connaissances du génome du modèle animal sélectionné conditionnent alors l'utilisation préférentielle de l'une ou l'autre des deux approches (Loup, 2008).

B.1 Systèmes « ouverts »

Plusieurs méthodes d'analyse du transcriptome existent en système ouvert. Les techniques sont très diversifiées et nombreuses mais peuvent être catégorisées en trois approches distinctes selon leur principe général. Ainsi, sont discernées les techniques:

- Fondées sur l'hybridation soustractive de deux populations d'ADNc. La SSH (pour *Subtractive Suppressive Hybridization*) est la plus représentative de ces approches (Diatchenko *et al.*, 1996 ; Gurskaya *et al.*, 1996). Le principe de la SSH consiste à éliminer physiquement toutes les espèces moléculaires communes aux deux populations que l'on souhaite comparer. Il s'agit d'hybrider les ADNc de la population contrôle avec ceux de la population exposée. Les séquences hybridées (espèces moléculaires bicaténaires) correspondent aux transcrits communs aux deux échantillons ; ces transcrits correspondent aux gènes dont

l'expression n'est pas affectée par les conditions expérimentales ; l'effet suppressif de la PCR permet d'éliminer ces fragments. Les espèces simple brin, quant à elles, correspondent aux transcrits différentiellement exprimés (Diatchenko *et al.*, 1996).

- Reposant sur l'amplification des ADNc par PCR avec au départ la DD-PCR (pour *Differential Display-PCR*) (Liang et Pardee, 1992) et l'AP-PCR (pour *Arbitrarily-PCR*) (Welsh et McClelland, 1990). Ces techniques appliquent des traitements parallèles aux deux échantillons à comparer. Ainsi, l'étape initiale étant la PCR, c'est l'ensemble d'une sous population des transcrits présents dans les échantillons d'origine qui sera amplifié. La mise en évidence des différences d'expression n'est réalisée que lors de l'étape finale par une simple comparaison des tailles des amplimers générés à partir des populations de transcrits à analyser.

- Reposant sur l'utilisation d'enzymes de restriction telles que la SAGE (pour *Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu *et al.*, 1995). Ces techniques permettent de comparer deux transcriptomes après leur avoir appliqué des protocoles identiques. Elles se fondent sur l'analyse séquentielle d'un grand nombre de courts fragments d'ADNc assemblés en de longs concatémères. L'ensemble de ces techniques exige le criblage de banques et/ou le séquençage des produits finaux afin d'identifier les transcrits d'intérêts ajoutant de la lourdeur aux méthodologies en système ouvert.

Mise à part la SAGE, les données générées par ces techniques ne fournissent qu'une indication qualitative (accroissement ou diminution) des niveaux de transcrits isolés. Cependant, des travaux visent à l'amélioration de ces techniques notamment en essayant d'en augmenter la sensibilité et d'intégrer la dimension quantitative (Liang *et al.*, 2007).

B.2 Systèmes « fermés » : le nombre de gènes à analyser est fixé au départ

Deux grandes techniques d'analyse du transcriptome en système fermé existent, l'une a grande échelle ; les puces à ADN, et l'autre plus ciblée ; la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).

- Les puces à ADN

Le principe de base des puces à ADN repose sur l'hybridation moléculaire, selon un schéma inverse du Northern blot. Les puces à ADN sont basées sur l'immobilisation, sur un support solide (silice, lame de verre, membrane de nylon) et à des positions déterminées, de sondes nucléiques de séquence connue dans le but d'hybrider et de séquestrer les séquences complémentaires présentes dans une population d'acides nucléiques marqués (fluorescence, biotinylation ou radioactivité), appelés les cibles (Lockhart et Winzeler, 2000 ; Freeman *et al.*, 2000). Les ADN fixés sont des oligonucléotides, des ADNc ou des fragments d'ADN génomique amplifiés par PCR. Le processus d'hybridation est à la fois dépendant du degré de complémentarité entre chaque cible et sa sonde associée et de la quantité de la cible présente au départ dans la population d'acide nucléique testée permettant l'évaluation de la quantité de chaque séquence nucléotidique possédant son complémentaire sur la puce. Toute cible n'ayant pas sa sonde immobilisée ne sera pas prise en compte dans l'expérimentation ; c'est pourquoi les puces à ADN sont qualifiées de système fermé (*Figure 10*).

La première puce à ADN date de 1995 (Schena *et al.*, 1995) chez *Arabidopsis thaliana* et comptait 45 sondes. Depuis, le développement de cette méthodologie s'est fortement diversifié autant du point de vue technique que des applications. Par exemple, grâce à la miniaturisation des techniques de dépôt ou de synthèse, des dizaines, voire des centaines de milliers d'ADN, de séquences différentes peuvent être fixés ou synthétisés sur le support solide de quelques centimètres carrés.

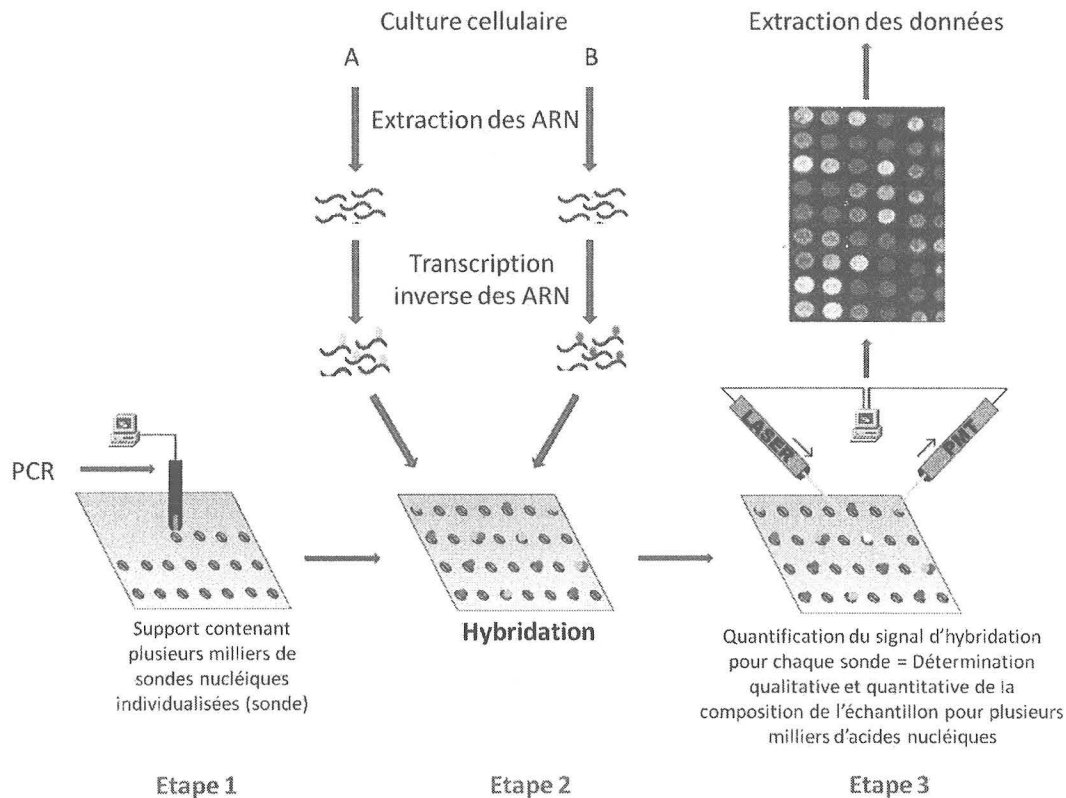


Figure 10 : Principe de fabrication d'une micropuce à ADN. La première étape consiste à fabriquer la micropuce : chaque puit correspond à un transcrit du génome considéré. L'ADNc de ce transcrit est déposé sur la surface précédemment recouverte de poly-lysine. Lorsque la goutte concentrée en ADN sèche, l'ADN adhère à la surface. Chaque puce peut contenir des milliers de puits. La seconde étape consiste à préparer le transcriptome exprimé des deux cellules (A et B) à tester. Chacune des cellules à comparer est cultivée séparément, leur ARN est extrait puis est soumis à une transcription inverse. A cette étape, l'ADN de la population des cellules A et B est lié à un marqueur fluorescent de couleur verte et rouge, respectivement. Puis, l'ADN marqué des deux cellules est mélangé. Il est ensuite piégé dans les puits par l'ADN qui lui correspond (hybridation à son complémentaire). La troisième étape consiste à comparer les niveaux d'expression des deux populations de cellules (A et B) sur la puce. Il s'agit toujours de niveaux d'expression relatifs entre les populations A et B. Les puits marqués en rouge correspondront aux gènes sur-exprimés dans la population B par rapport à A, ceux en verts aux gènes sous-exprimés. Les puits jaunes mettent quant à eux en évidence les gènes dont le niveau d'expression est le même dans les deux populations. Ainsi, une puce permet d'observer le profil d'expression de génomes entiers (Source : Modifié de Le Crom, 2005).

Les puces à ADN sont aussi appelées « macroarrays », « microarrays » ou « DNA chips ». Ces terminologies font référence à trois entités différentes mais, les nombreux abus de langage ont abouti à leur utilisation en dehors de leur spécificité pour désigner n'importe quel type de puce ou biopuce. Ainsi, essentiellement trois types de puces sont distingués :

- Les macroarrays ou macropuces correspondent aux premières puces développées sur membranes en nylon sur lesquelles les sondes sont constituées de fragments d'ADN complémentaire (densité de 200 à 5000 ADN par puce) déposées avec un espacement de l'ordre du millimètre et associées à des cibles radiomarquées.
- Les micropuces à ADN ou microarrays indiquent par leur préfixe une miniaturisation plus poussée que les premières. Les dépôts de produits PCR se font sur lame de verre, les acides nucléiques étant séparés de 200 à 400 micromètres autorisant une plus forte densité (de 1000-30000 ADN par puce) sur une surface plus petite. Les cibles associées à ces puces sont généralement marquées par fluorescence (fluorophores Cy3 et Cy5) et les ADNc marqués peuvent provenir de deux échantillons et être hybridés simultanément (*Figure 10*).
- Enfin, d'un point de vue étymologique, les véritables puces à ADN (« DNA chips ») correspondent à des lames en silice sur lesquelles des oligonucléotides spécifiques à chaque gène d'un organisme sont synthétisés *in situ* grâce à un procédé de photolithographie. Elles furent initialement développées par la société *Affymetrix*.

Les puces à ADN sont utiles dans toutes les expériences dont le but est de déterminer la présence et la quantité d'acides nucléiques (ARN ou ADN) de séquences données. L'application la plus courante est l'analyse d'un transcriptome par quantification des ARNm mais ces outils peuvent également être employés à des fins de criblage de mutation (Ahrendt *et al.*, 1999), de séquençage nucléaire (Hacia, 1999), d'études phylogénétiques (Cho et Tedje, 2001) et de caractérisation physique du génome (Pollack *et al.*, 1999 ; Pollack et Iyer, 2002 ; Shannon et Rao, 2002).

L'application des puces à ADN dans l'étude différentielle des transcriptomes est basée sur la génération de deux populations de cibles marquées issues des ARN extraits des échantillons des deux conditions à comparer. L'hybridation des cibles et des puces peut alors être envisagée, soit séparément, soit en mélangeant les deux populations de cibles lorsqu'elles sont marquées par fluorescence, à condition d'utiliser deux fluorochromes distincts. Ensuite, la simple comparaison des signaux associés à chaque sonde selon la cible envisagée permet la détermination des niveaux différentiels d'expression de messagers.

- PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La qRT-PCR (pour *quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) est une méthode inspirée de la PCR « conventionnelle ». La PCR est une technique de duplication à l'identique d'une séquence ciblée d'ADN. Dans cette dernière, deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques viennent s'apparier de part et d'autre d'une séquence connue d'ADN à amplifier. Une ADN polymérase peut alors synthétiser le segment d'ADN compris entre ces 2 amorces. Le produit de cette réaction est un segment double brin dont les extrémités correspondent aux extrémités 5' des amorces utilisées et dont la longueur correspond à la distance comprise entre les 2 amorces. Avec cette technique, seules les quantités de produit amplifié après arrêt de la réaction peuvent être visualisées sur un gel en donnant une indication semi-quantitative de la présence d'une séquence entre deux échantillons.

Dans le cadre de l'étude différentielle du transcriptome, cette technique a nécessité le développement de la détection du produit ciblé pendant son amplification. La qRT-PCR permet la mesure et la visualisation de l'amplification en temps réel grâce à l'émission de fluorescence à chaque cycle PCR (Bustin *et al.*, 2005). De manière simpliste, un réactif fluorescent est inclus dans la composition du volume réactionnel et ce dernier n'acquière sa propriété d'émetteur de fluorescence que s'il détecte un ADN bicaténaire, si ce dernier augmente en nombre alors, le signal de fluorescence augmente. Deux natures de sondes fluorescentes sont rencontrées : les non-spécifiques qui sont en fait des agents intercalants de l'ADN comme le « SYBR Green » qui

n'émet que lorsqu'il est complexé à de l'ADN double brin et, les spécifiques qui sont de vraies sondes nucléiques complémentaires de leur cible et associées à des fluorochromes et/ou des extincteurs (« quenchers »). La nature de ces sondes spécifiques et leurs principes de détection sont multiples mais, comme pour le SYBR Green, elles ont en commun d'augmenter le signal de fluorescence lorsque le nombre de cibles augmente au cours de la réaction de PCR.

Appliquée à l'étude du transcriptome, cette technique nécessite de travailler avec des ADNc, qui ont été obtenus par transcription inverse des ARN extraits à partir des différents échantillons à comparer (Bustin *et al.*, 2005). Les transcrits d'intérêt sont ensuite ciblés par des amorces spécifiques procurant le caractère « fermé et limitant » de la technique. En effet, même si par l'utilisation de plusieurs fluorochromes et amorces spécifiques, des réactions en multiplex sont concevables, le nombre de cibles amplifiées simultanément reste faible. Cette limite explique alors l'utilisation ciblée de la qRT-PCR à des fins de validation d'études plus globales comme les puces à ADN.

Cependant, cette technologie est très sensible et permet la détection de transcrits très faiblement exprimés. Elle peut à la fois être utilisée en quantification absolue ou relative. Cette quantification est basée sur la détection du signal de fluorescence au dessus d'un seuil minimal supérieur au bruit de fond. Le nombre de cycles d'amplification nécessaires à cette détection est fonction de la quantité de départ de la cible dans l'échantillon. De ce fait, un transcrit fortement exprimé sera détecté sur les premiers cycles d'amplification alors que les ARNm peu exprimés seront visualisés en fin de programme de PCR. La comparaison des signaux entre échantillons, ou contre une gamme de quantités connues et amplifiées en même temps, autorise respectivement la quantification relative ou absolue.

Pour préciser la quantification de l'expression des gènes, il est crucial de normaliser les données avec des gènes ayant des expressions stables dans les conditions de l'étude. En effet, des facteurs, comme la taille des échantillons, la quantité et la qualité de l'ARN et l'efficacité de la rétrotranscription pour la synthèse d'ADNc, peuvent influencer la qRT-PCR et doivent être pris en compte dans la normalisation (Dheda *et al.*, 2004). L'expression différentielle des gènes d'intérêts est donc normalisée et quantifiée par rapport à l'expression d'un gène de référence (ou

« *housekeeping gene* ») dont l'expression n'est pas influencée par les conditions expérimentales. Dans un même échantillon, ces gènes de référence sont présents avec les gènes d'intérêt.

- Complémentarité des deux techniques

Les puces à ADN permettent l'évaluation des niveaux d'un grand nombre de transcrits en même temps dans quelques échantillons biologiques en peu de temps. La qRT-PCR, quant à elle, permet la mesure de l'expression de quelques transcrits dans de nombreux échantillons simultanément. Ces deux méthodes sont souvent utilisées de manière complémentaire afin d'identifier dans un premier temps les transcrits présentant une expression différentielle par la technique de micropuces et dans un deuxième temps de pouvoir quantifier l'expression des transcrits cibles par qRT-PCR.

C- Nouvelle génération de séquençage (NGS)

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Décrit il y a environ 30 ans (Maxam et Gilbert, 1977 ; Sanger *et al.*, 1977), il est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire et n'a cessé d'évoluer. Notamment, l'une des premières techniques de séquençage de l'ADN, la méthode de Sanger a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes, tel que celui du génome humain (« *Human Genome Project* ») complètement déchiffré en 2003 ou d'autres génomes comme par exemple le génome bactérien, le premier d'entre eux étant celui d'*Haemophilus influenzae*, complètement décrit en 1995 (Lamoril *et al.*, 2008). Les séquençages d'ADN réalisés par cette méthode utilisent la réaction de polymérisation de l'ADN à l'aide d'une ADN polymérase et des didésoxyribonucléotides (ddNTP). Néanmoins, cette technique prend beaucoup de temps et présente des coûts relativement élevés. Toutefois, son automatisation à la fin des années 1980, avec le développement des marquages fluorescents et de l'électrophorèse

capillaire, a ouvert la voie du séquençage à haut débit. La méthode de Sanger automatisée est considérée comme étant la stratégie de séquençage haut-débit de première génération. Depuis, de nouvelles méthodes ont été mises au point et les techniques à haut débit de séquençage, appelées « nouvelle génération de séquençage » (NGS pour *Next Generation Sequencing*) permettent d'obtenir rapidement un grand nombre de séquences sur un grand nombre d'échantillons pour des coûts moindres par rapport à la méthode de Sanger.

Le marché des NGS de deuxième génération est actuellement dominé par 3 différents groupes : Roche, Illumina et Life Technologies, ayant proposés successivement leurs plateformes à savoir le 454 (*454 Life Sciences*, Brandford, CT ; maintenant *Roche Diagnostics*), le Genome Analyser (*Illumina*, San Diego, CA ; initialement développé par *Solexa*) et enfin le SOLiD (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA ; maintenant *Life Technologies*) (Marguerat et Bähler 2009 ; Nowrousian, 2010). Sur chacune des trois plates-formes, des fragments d'ADN sont séquencés en parallèle, produisant un grand nombre de séquences relativement courtes appelées « *reads* » ou « *tags* ». La production et l'analyse des banques séquencées par ces trois plates-formes, en dépit de leurs différences technologiques, se fondent sur une méthodologie semblable. D'abord, les échantillons d'acides nucléiques doivent être fragmentés afin d'atteindre une taille compatible avec le séquençage (typiquement 500 pb). En second lieu, des adaptateurs d'ADN contenant des séquences uniques sont attachés aux deux extrémités des fragments d'ADN. Ces adaptateurs permettent plus tard aux fragments d'ADN d'être choisis, sur des billes ou puces (« *flowcell* »), pour être alors séquencés en parallèle. Les trois systèmes diffèrent dans les approches utilisées pour produire ces quantités massives de séquences (Marguerat et Bähler, 2009).

C.1 Le pyroséquençage haut débit (454)

Le pyroséquençage est une méthode permettant d'analyser la synthèse d'ADN cible en temps réel. On parle de séquençage par synthèse d'ADN (Ronaghi *et al.*, 1998). Le principe de base de la méthode consiste à hybrider une amorce à l'ADN cible (amplifiée par PCR), puis à ajouter

séquentiellement, et dans l'ordre, une base à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. Chaque base est marquée par un fluorophore différent dont le signal est mesuré par bioluminescence à condition que la base complémentaire de la cible soit incorporée. La séquence est déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néosynthétisée (Lamoril *et al.*, 2008). Le pyroséquencage se déroule en différentes étapes illustrées dans la *figure 11*.

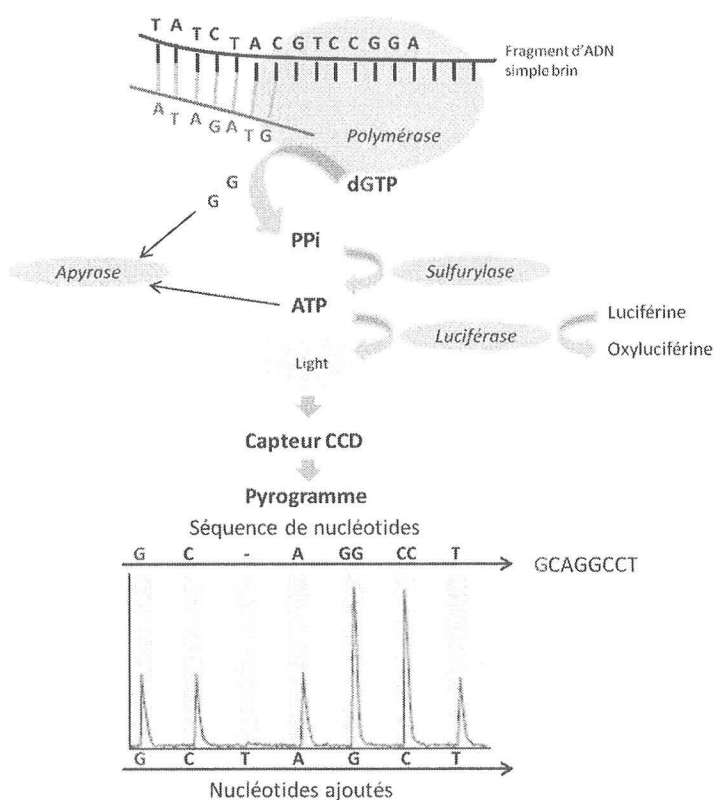


Figure 11 : Principe du pyroséquencage. La première étape consiste à préparer le mélange réactionnel ; l'amorce de séquençage est hybridée à la matrice d'ADN simple brin, et incubée avec différentes enzymes (l'ADN polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciférase et l'apyrase) et des substrats (Adénosine 5'phosphosulfate (APS) et luciférine). Ensuite, les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans une réaction de séquençage normale mais l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé

dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et libère un pyrophosphate (PPi). L'ATP sulfurylase transforme alors quantitativement ce PPi en ATP qui est alors utilisé, couplé à une luciférine, par une luciférase. On a alors production d'oxyluciférine et d'un signal lumineux. L'apyrase dégrade les nucléotides non incorporés et l'ATP en surplus. Puis, le signal lumineux est capté par un capteur CCD (pour *Charge-Coupled Device*) et est reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. Le processus continue avec l'ajout du prochain dNTP. On peut donc déduire la séquence à partir de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet de déduire la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.

L'arrivée d'automates, tel que le pyroséquençage inclus dans le « 454 » a permis le développement de cette technique à une échelle plus grande en permettant le séquençage massif et en parallèle. A chaque utilisation, cette approche fournit généralement plusieurs centaines de milliers de séquences par série, là où la méthode de Sanger est limitée au nombre de puits sur une plaque PCR. Cette technologie de 454 conçue par J. Rothberg, est fondée sur l'intégration de plusieurs techniques telles que le pyroséquençage, les technologies des plaques en fibres optique picotitré contenant 1,6 millions de puits et la PCR en émulsion (emPCR) dans des microréacteurs micellaires (300 000 réactions PCR en parallèle) (Margulies *et al.*, 2005).

La grande quantité de séquences générées vient de la préparation des échantillons. Les fragments d'ADN sont isolés, puis amplifiés par PCR (emPCR) sur des microbilles. Ces billes sont déposées dans les puits de plaques de microtitration (jusqu'à 1 à 2 millions de billes/plaque) (*Figure 12*). Puis, comme dans une réaction de pyroséquençage classique (décrite précédemment), les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) sont incorporés un par un ; et, si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse. Il y a libération d'un pyrophosphate et production d'un signal lumineux par un processus enzymatique, capté sur un pyrogramme (*Figure 12*). Cette technologie, qui auparavant fournissait des fragments de séquences courts d'environ 50 à 100

paires de bases nucléotidiques, permet avec l'avènement des technologies dites « FLX » puis « FLX Titanium » d'obtenir des fragments d'une longueur supérieure à 400 paires de bases. De cette façon, le pyroséquencage peut fournir des informations étendues d'un génome et ainsi générer de nouvelles observations sur l'expression des gènes dans différents tissus, cellules ou micro-organismes associés.

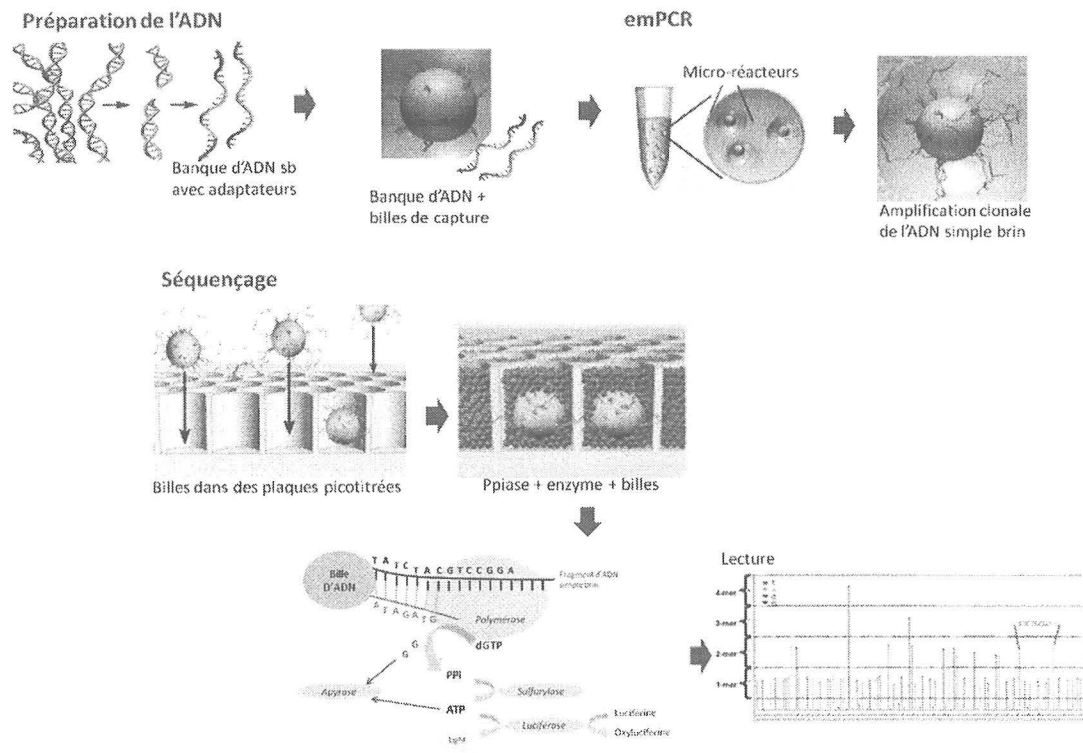


Figure 12 : Etape du pyroséquencage haut débit. La première étape consiste à préparer la banque d'ADN simple brin (ADNsb). Pour cela, l'ADN génomique est fragmenté par nébulisation et des adaptateurs sont fixés aux deux extrémités. Ensuite, des microbilles avec en surface des amorces complémentaires à un des adaptateurs permettent de fixer une molécule d'ADNsb à la fois. Ces microbilles sont alors mises en émulsion en présence de réactifs pour PCR (emPCR). Chaque goutte (micro-réacteurs) englobe une microbille et donc une molécule d'ADN, permettant l'amplification clonale de chaque fragment. Enfin, les micro-réacteurs sont dissociés et les microbilles porteuses de l'ADNsb

largement amplifié sont pipetés dans une plaque picotitrée, permettant un séquençage en parallèle selon le principe du pyroséquençage décrits ci-dessus. Les séquences d'ADN sont alors déterminées.

C.2 Le séquençage Illumina

Le séquençage commercialisé par la société Illumina/Solexa se fonde sur l'intégration de plusieurs techniques telles que les biopuces à ADN, les nanotechnologies ainsi qu'une variante de la méthode de Sanger appelé CRT (pour *cyclic reversible termination*) correspondant à l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents (*Figure 13*). Il s'agit d'un séquençage en temps réel, basé sur le principe du « séquençage par synthèse d'ADN » et sur la détection de la fluorescence, mais en présence des 4 nucléotides marqués. La très haute densité de la puce (plus de 100 millions de molécules par centimètre carré) permet de séquencer environ 100 000 paires de base par seconde. Les séquences générées ont une taille comprise entre 35 et 160 pb. Les différentes étapes du séquençage Illumina sont décrites dans la *figure 13*.

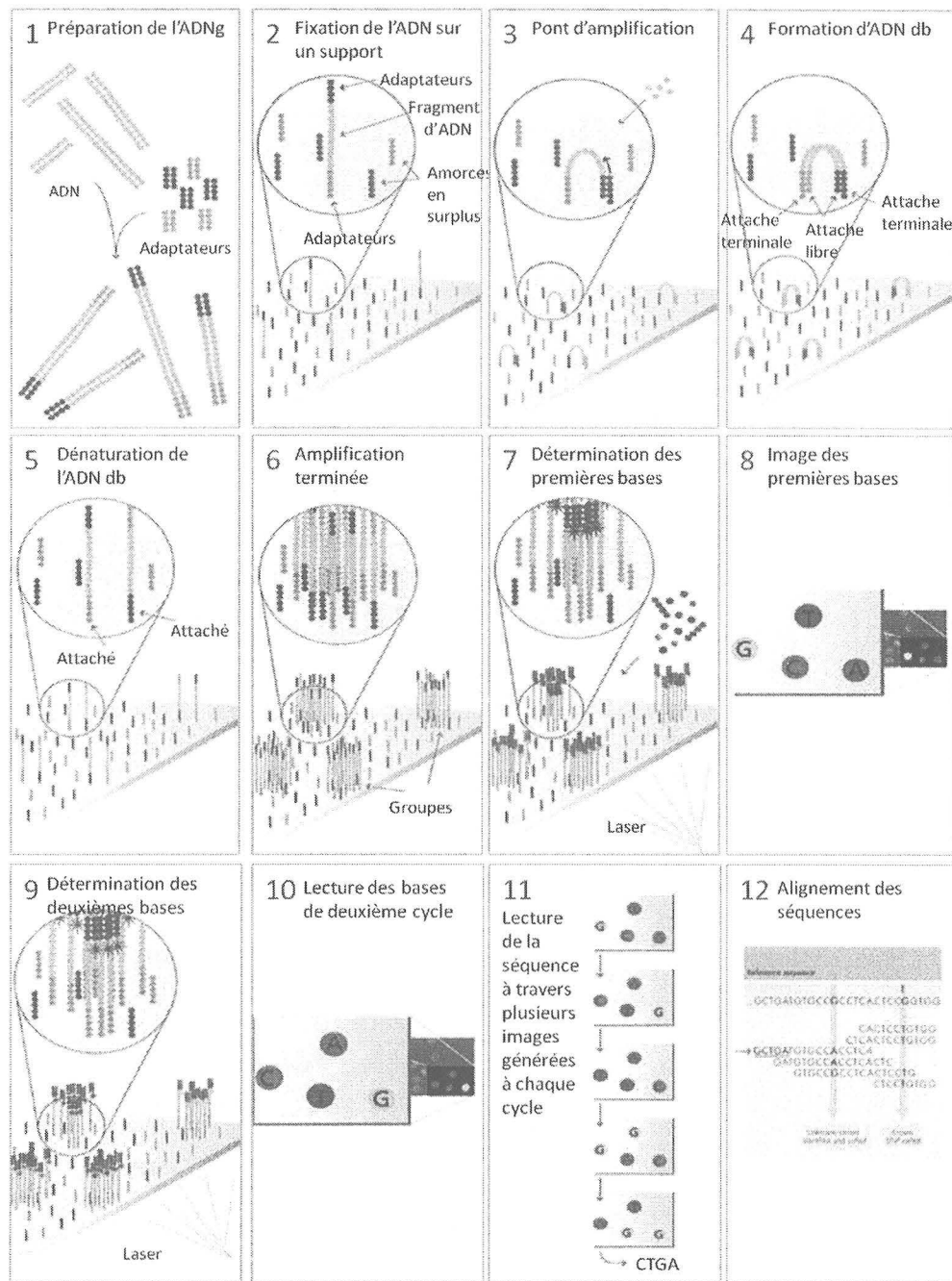


Figure 13 : Etapes du séquençage Illumina. La première étape (1) consiste à préparer la banque d'ADN génomique. L'ADN génomique est fragmenté par nébulisation et des adaptateurs sont fixés sur chaque

extrémité par ligation. Ensuite, grâce aux adaptateurs, les fragments d'ADN sont fixés sur la puce (2). Puis, des nucléotides et des enzymes sont ajoutés afin d'initier l'amplification en phase solide et de créer des ponts d'amplification doubles brins (3 et 4). La formation des ponts d'amplification permet d'obtenir une haute densité de brins d'ADN, ce qui facilite et augmente le débit de séquençage. Les ponts d'amplification doubles brins sont alors dénaturés (5), et les ADNs simples brins sont amplifiés de sorte que des groupes soient formés (6). Ensuite le séquençage des fragments se fait par synthèse en utilisant l'approche CRT. Le premier cycle de séquençage commence par l'ajout des 4 terminateurs réversibles, les amorces et l'ADN polymérase (7). Après une excitation laser, la fluorescence émise par chaque groupe est capturée et les premières bases sont identifiées (8). Les cycles sont répétés de la même façon afin de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour chaque séquence, une base à la fois (9-10-11). La technologie est basée sur la lecture de courts fragments. Enfin les données sont analysées avec un logiciel approprié (12) (Source : adapté de <http://www.illumina.com>.)

C.3 Le séquençage SOLiD

La technologie ABi SOLiD (pour *Applied Biosystems' « Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection »*) est basée sur l'amplification par émulsion et utilise le séquençage par ligation avec une ADN ligase (*Figure 14*).

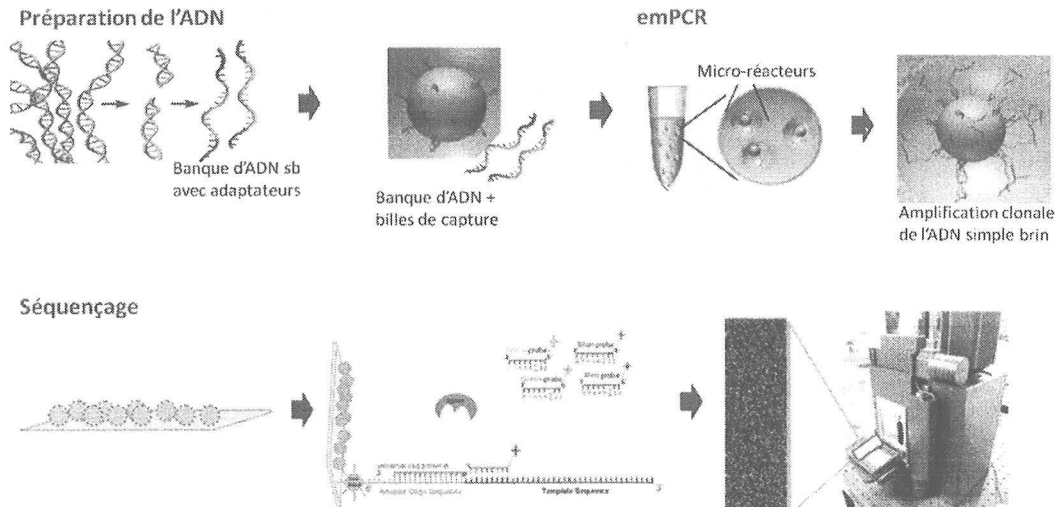


Figure 14 : Séquençage ABi SOLiD. De la même façon que la technologie 454, des banques d'ADN sont préparées et amplifiées par PCR à émulsion (emPCR). Les microbilles sont alors déposées de façon aléatoire et le séquençage par ligation est effectué par des cycles répétés d'hybridation avec des amorces de séquençage. Enfin, les séquences sont identifiées grâce aux sondes fluorescentes marquées codant pour les bases (Source: modifié de Strausberg *et al.*, 2008)

C.4 Comparaison de ces techniques

La première NGS commercialement disponible était le pyroséquenceur 454 en 2005. Alors que les premières machines étaient capables de délivrer des « reads » de longueurs d'environ 100 bases, les générations actuelles d'instruments et de chimie (FLX Titanium puis FLX+) atteignent des « reads » comprises entre 80 et 700 paires de base. Ces séquences sont les plus longues pouvant actuellement être obtenus par les NGS. En effet, les systèmes Illumina et ABi SOLiD fournissent des « reads » de seulement 30 à 150 paires de base. Cependant, la technologie 454 présente un débit plus faible et des coûts par base plus élevés que les autres systèmes. Le débit varie des centaines de milliers de « reads » pour le système FLX aux centaines de millions de « reads » pour les systèmes Illumina et ABi SOLiD (Marguerat et Bähler, 2010 ; Nowrousian, 2010). La *figure 15* résume les caractéristiques des différentes technologies. Il est important de

noter que ces technologies évoluent extrêmement rapidement, avec des nombres et des longueurs de « reads » toujours croissant. Notamment, parmi ce panel, le PGM, *Ion torrent* est le seul à connaître une évolution constante en terme de capacités de séquençage (10Mb – reads de 100b – Juin 2011 / 100Mb – reads de 100b – Sept 2011 / 100Mb – reads 200b – Nov 2011 / 1Gb – Jan 2012). La position actuelle dans laquelle nous nous trouvons, entre la commercialisation de certains séquenceurs et ceux en cours de développement, est caractéristique d'une période charnière dissociant les technologies à haut débit dites de deuxième génération qui requièrent une étape d'amplification des molécules d'ADN en amont du décodage, de celles dites de troisième génération permettant le décryptage direct d'une seule molécule d'ADN.










Société	Roche			Illumina				Life Technologies			
Plateforme											
Technologie	GS Junior	454 FLX Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	FLX + Titanium	
Isolation et purification de l'ADN/ARN cible : acides nucléiques (matrice)											
↓											
Préparation des échantillons : ligation des adaptateurs											
↓											
Méthode d'Amplification	PCR en émulsion			« Bridge PCR »				PCR en émulsion			
Méthode de séquençage	Synthèse (Pyroséquençage)			Synthèse				Ligation			
Durée de séquençage/run	10 à 20h			26h	8 à 14 jrs			2h	8 à 12 Jrs		
Capacité (Mb) séquençage/run	50	500 à 900		1500	95000 à 200000			10 à >1000	70000 à 150000		
Taille moyenne des reads	400	700		100 à 150 + 100 à 150				> 100	50 à 75 + 35		
Coûts (\$)/run	1100	6200		750	10000 à 20000			500 à 950	8150 à 10500		
Coûts machine + annexes (K\$)	110 + 25	500 + 30		125	560	690	250	50 + 20	350 à 600 + 55		
Exactitude de séquençage (%)	99			99,9				99	99,95	99,99	

Figure 15 : Les différentes technologies de NGS et leurs caractéristiques (Source : modifié de <http://www.biorigami.com>)

L'obstacle le plus significatif avec n'importe quelle approche de NGS est l'analyse des quantités considérables de données produites par ces expériences. De plus, les « reads » issues de ces NGS sont relativement courts, ce qui limite l'utilisation des plateformes pour l'assemblage et l'annotation des génomes. De ce fait, ces technologies exigent des outils bio-informatiques puissants et fonctionnels, qui se sont d'ailleurs développés ces dernières années (Marguerat et Bähler, 2010 ; Nowrousian, 2010; Goncalves *et al.*, 2011).

C.5 Applications de ces technologies de nouvelle génération de séquençage pour l'étude du transcriptome

Les NGS peuvent être employées pour une large variété d'approches expérimentales fortement intéressantes. La *figure 16* résume ces principales approches et leurs applications biologiques.

Une des applications la plus évidente de ces technologies de séquençage à haut débit est le **séquençage du génome**. Nous pouvons différencier le « re-séquençage » c'est-à-dire le séquençage des génomes à partir d'espèces pour lesquelles un génome de référence est déjà disponible, et le « séquençage *de novo* ». Dans le cas du re-séquençage, les courtes séquences produites par les NGS peuvent être alignées avec un haut niveau de confiance sur le génome de référence. Cette approche fonctionne bien, même avec les grands génomes, comme ceux des mammifères tels que les bovins ou l'Homme (Bentley *et al.*, 2008 ; Wheeler *et al.*, 2008 ; Eck *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2009 ; Pushkarev *et al.*, 2009). Les « reads » alignées contre le génome de référence peuvent être utilisées pour identifier les polymorphismes de nucléotide simple (SNPs), les petites insertions ou délétions (indels), et les variations de nombre de copies (CNV) ou d'autres variations de structures, tous ces résultats aidant à une meilleure compréhension des bases génétiques des différences phénotypiques (Nowrousian, 2010). Dans le cas du séquençage *de novo*, l'assemblage des séquences, suivie de l'annotation sont des étapes importantes. Au départ, les séquences de courtes longueurs générées par les NGS posaient des problèmes pour l'assemblage, en particulier pour les grands et plus complexes génomes des eucaryotes. Les bactéries sont donc les premiers génomes ayant été séquencés *de novo* (Farrer *et al.*, 2009 ;

Margulies *et al.*, 2005 ; Reinhardt *et al.*, 2009). Toutefois, l'amélioration des techniques permet aujourd'hui d'assembler des génomes eucaryotes. Les deux premiers génomes eucaryotes assemblés seulement à partir des « reads » issues des NGS sont ceux du panda géant, assemblé à partir des « reads » de Solexa (Li *et al.*, 2010), et le champignon filamenteux *Sordaria mascrospora*, assemblés à partir d'une combinaison de « reads » issus de Solexa et 454 (Nowrousian *et al.*, 2010).

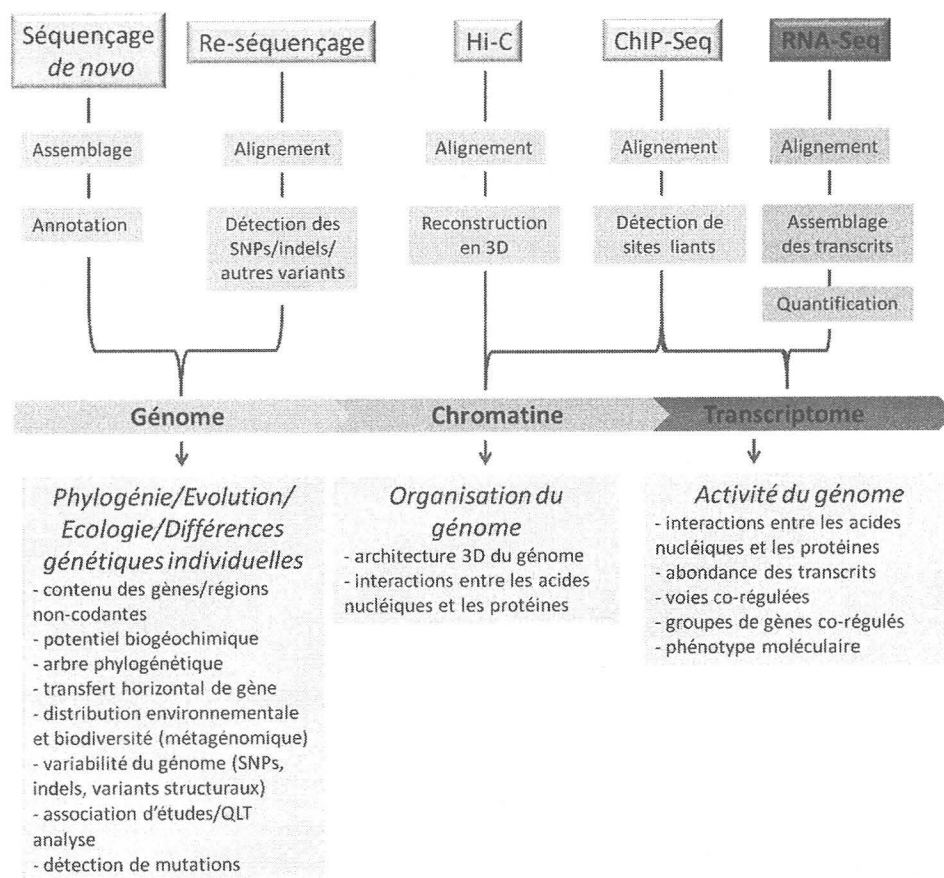


Figure 16 : Les différentes applications des NGS afin de répondre à des questions biologiques. SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide ; indel : insertion/délétion ; QLT : quantitative trait loci. (Source : modifié de Nowrousian, 2010).

Les technologies de NGS peuvent aussi être utilisées pour **analyser l'organisation des génomes**. Des exemples sont les méthodes Hi-C, ChIP (chromatin immunoprecipitation)-seq, et methyl-seq (*Figure 16*).

Enfin, après le séquençage des génomes, le séquençage de l'ADNc représente un des champs pour lesquels les NGS se sont rapidement appliqués et avec succès, permettant **l'analyse du transcriptome**, notamment **l'analyse de l'expression des gènes**. L'utilisation des NGS pour obtenir des données transcriptomiques est collectivement connue comme « *RNA deep sequencing* » ou « *RNA-seq* » (Wang *et al.*, 2009) (*Figure 16*). Les premières études ont été publiées en 2008 pour les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Nagalakshmi *et al.*, 2008) et *Shizosaccharomyces pombe* (Wilhelm *et al.*, 2008), les plantes *Arabidopsis thaliana* (Lister *et al.*, 2008) ainsi que pour les cellules de mammifères (Cloonan *et al.*, 2008 ; Mortazavi *et al.*, 2008) et depuis pour divers organismes (Marguerat et Bälher, 2010).

- Analyse des niveaux d'expression : la technologie *RNA seq*

La technologie *RNA-Seq* permet de faire une étude qualitative et quantitative de la population totale des transcrits exprimés dans un type cellulaire donné. Pour cela, des millions de courts fragments sont générés et séquencés par une NGS. En principe, n'importe quelle NGS peut être employée pour le *RNA-Seq*. Les systèmes 454 (Jeukens *et al.*, 2010), Illumina (Daines *et al.*, 2011 ; Laing *et al.*, 2011) et ABi SOLiD (Siebert *et al.*, 2011) ont déjà été utilisés pour cette application. Après le séquençage, les courtes séquences résultantes sont alignées sur un génome ou transcriptome de référence ou assemblées *de novo* pour produire une carte de transcription à l'échelle du génome qui se compose de la structure transcriptionnelle et/ou du niveau d'expression pour chaque gène (Wang *et al.*, 2009) (*Figure 17*).

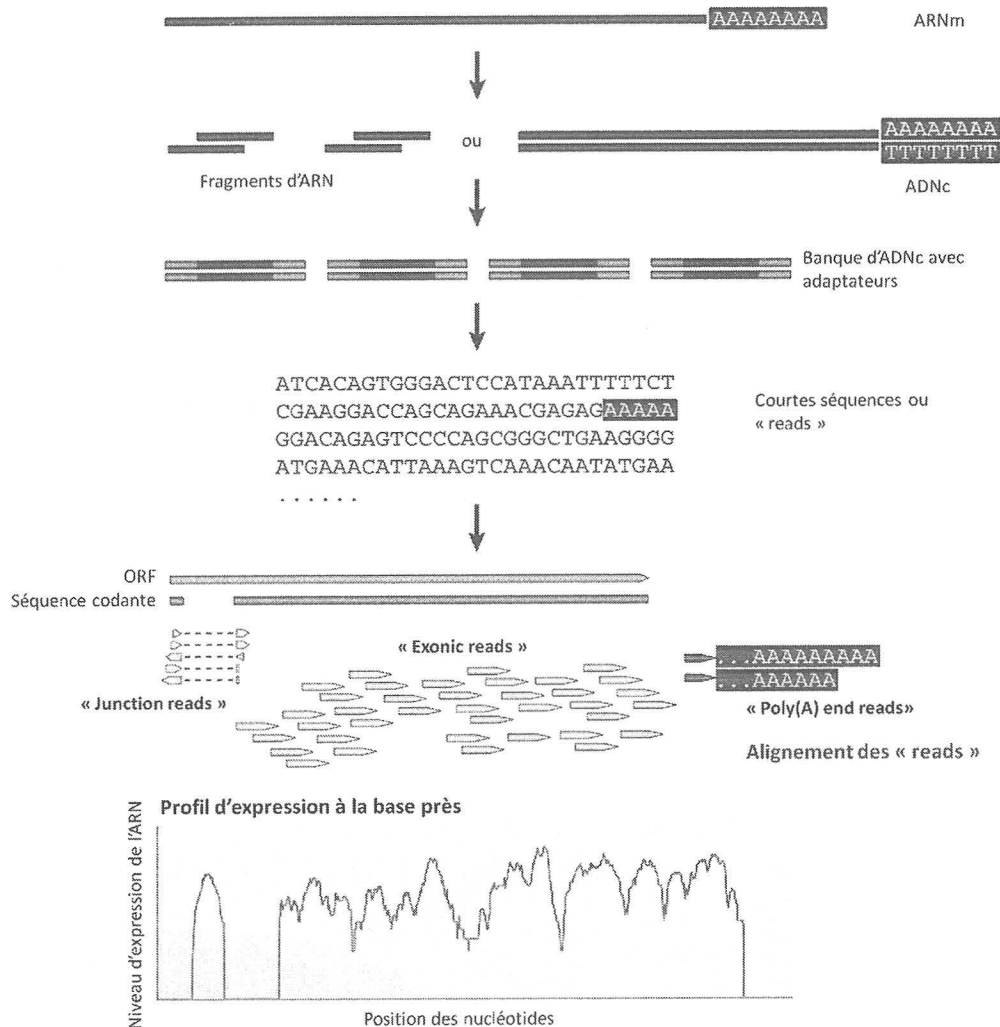


Figure 17: Une expérimentation typique de RNA-Seq. Brièvement, les ARNs de longues tailles sont tout d'abord convertis en une banque de fragment d'ADNc à travers une fragmentation de l'ARN ou de l'ADN. Des adaptateurs de séquençage (en bleu) sont ensuite ajoutés aux fragments d'ADNc et de courtes séquences ou « reads » sont obtenues par une NGS. Ces séquences résultantes sont alignées sur le génome ou transcriptome de référence, et classées en trois types : « exonic reads », « junction reads », et « polyA end-reads ». Ces 3 types sont utilisés pour générer un profil d'expression à la base près pour chaque gène, comme illustré en bas de la figure ; un ORF de levure avec un intron est montré (Source : Wang *et al.*, 2009).

RNA-Seq offre plusieurs avantages clés par rapport aux autres technologies d'analyse du transcriptome. Tout d'abord, cette application n'est pas limitée à la détection de transcrits correspondant à des séquences génomiques déjà existantes. Ceci est particulièrement attrayant pour des organismes non-modèles dont les séquences génomiques ne sont pas encore connues. De plus, la technologie *RNA-Seq* a une résolution à la base près permettant l'analyse de régions ayant de fortes homologies (des séquences répétées par exemple), de SNP, des bordures exoniques, des profils d'épissage alternatif et l'étude des isoformes de protéines. Ces facteurs rendent *RNA-Seq* utile pour étudier les transcriptomes complexes. En outre, cette technologie n'a pas de limite supérieure pour la quantification, qui est corrélée avec le nombre de séquences obtenus. En conséquence, cette technique est très sensible (« *dynamic range of expression* »), 10 à 100 fois plus élevé que les puces à ADN, et permet une quantification des ARN et la détection d'ARN rares. Enfin, *RNA-Seq* est utilisée pour étudier l'expression différentielle de transcrits par comparaison des résultats obtenus avec des banques issues de différents tissus et/ou traitements. Cette technique a été démontrée, en utilisant la qRT-PCR, être très précise (Nagalakshmi *et al.*, 2008) et reproductible au niveau technique et biologique (Cloonan *et al.*, 2008). L'énorme quantité de données générées par cette approche demande cependant des outils informatiques puissants et une certaine rigueur.

D- Étude du transcriptome chez les bivalves

La connaissance du génome est limitée chez les mollusques. Conséquemment, les SSH sont des techniques moléculaires qui ont été largement utilisées dans les études du transcriptome des bivalves (Gestal *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008 ; Huvet *et al.*, 2004 ; Tanguy *et al.*, 2004 ; Perrigault *et al.*, 2009), bien que plus récemment, l'utilisation des puces à ADNc, construites à partir de banques de SSH de l'huître pacifique *C. gigas* et de moule zébrée *Dreissena polymorpha* ont été décrites (Fleury *et al.*, 2009 ; Xu et Faisal, 2009 ; Lang *et al.*, 2009). Par

ailleurs, une analyse fonctionnelle à grande échelle de l'expression de séquences d'intérêt (EST : « Expressed Sequence Tag ») séquencées à partir de différents tissus de *M. galloprovincialis* exposés à des polluants toxiques, à des températures variables et à des bactéries pathogènes potentiels a été réalisée. Une base de donnée (Mytibase) regroupe ces ESTs de *M. galloprovincialis* qui inclus 7 112 transcrits uniques (Venier *et al.*, 2009). A partir de la Mytibase, une nouvelle micropuce de moules a été définie comme un outil flexible pour la validation expérimentale de séquences immunitaires candidates et sa performance a été testée sur les hémocytes de *M. galloprovincialis* exposés à des *Vibrio* (Venier *et al.*, 2011). Ces auteurs ont alors proposé une modélisation intéressante du transcriptome de la réponse des hémocytes de *M. galloprovincialis* injectées avec des *Vibrio*. De plus, récemment, un catalogue de transcrits de gènes sur-régulés à partir d'huîtres survivantes à l'infection avec des souches de *Vibrio* virulentes (*V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* LPi 02/41) a été généré en utilisant une technique dérivée de SAGE, le « *Digital Gene Expression* » (DGE) et a permis d'identifier des fonctions cellulaires et immunitaires caractérisant la capacité des huîtres à survivre à des infections par des *Vibrio* pathogènes. Les annotations fonctionnelles ont mis en évidence des gènes relatifs à la transduction du signal dans les réponses immunitaires, à l'adhésion et à la communication des cellules aussi bien qu'aux processus cellulaires et aux mécanismes de défenses comme la phagocytose, le cytosquelette d'actine, les réactions antioxydantes et anti-apoptiques (de Lorgevil *et al.*, 2011).

Avec l'émergence des nouvelles techniques de séquençage, le génome est de plus en plus étudié, permettant un séquençage rapide pour l'étude du transcriptome de diverses espèces. En effet, la première utilisation de pyroséquencage avec un bivalve a été décrite par Craft *et al.* (2010). Dans cette étude, les séquences EST ont été déterminées dans quatre tissus de *M. galloprovincialis*. Les analyses comparatives tissu-spécifiques des transcrits ont informé sur plusieurs aspects de biologie de *Mytilus* et l'ensemble des données a ouvert de nouvelles lignes de recherche sur la biologie des moules. Un autre pyroséquencage haut-débit 454 a été réalisé chez le bivalve

Antarctique *Laternula elliptica* et a permis d'augmenter les connaissances sur le processus de dépôt et de réparation de la coquille des mollusques (Clark *et al.*, 2010).

Aussi, des banques d'ADN complémentaire (ADNc) normalisées ont été construites à partir des branchies des moules *Bathymodiolus azoricus* et à partir d'un mélange de tissus adultes de palourdes *Ruditapes phillipinarum* et pyroséquencées par la technologie 454 (respectivement : Bettencourt *et al.*, 2010; Milan *et al.*, 2011). Pour les bathymodiales, les séquences assemblées résultent en 39 425 transcrits. Des recherches dans les bases de données ont été réalisées afin d'annoter les séquences et certaines d'entre elles ont été assignées à des termes de *Gene Ontology* (GO) (Bettencourt *et al.*, 2010). Les termes GO sont beaucoup utilisés pour effectuer une classification des gènes et permettre des annotations fonctionnelles en utilisant un vocabulaire contrôlé et une hiérarchie qui inclut les fonctions moléculaires, les processus biologiques et les composants cellulaires (Bard *et al.*, 2004). Chez les palourdes, l'assemblage des séquences obtenues résultent en 32 606 uniques transcrits dont 9 747 ont pu être annotés. Avec les séquences d'intérêts, une oligopuce à ADN a été fabriquée. Un profil d'expression de gène dans la glande digestive et la branchie a alors été établi et a permis d'identifier un large panel de gènes potentiellement impliqués dans les réponses cellulaires aux stress environnementaux (Milan *et al.*, 2011).

De plus, un séquençage *de novo* du transcriptome du pétoncle du Japon *Patinopecten yessoensis* a été réalisé (Hou *et al.*, 2011). Un ensemble de 805 330 reads a été produit par un séquençage 454 et assemblé en 32 590 contigs. Un total de 25 237 transcrits uniques codant des protéines a été identifié à partir d'un ensemble de tissus issus d'individus à différent stade du développement et d'adultes. Ces séquences recouvrent diverses fonctions et processus biologiques comme indiqué par l'annotation avec des termes GO. Ainsi, des transcrits potentiellement impliqués dans la croissance, la reproduction et les réponses immunitaires et aux stress ont été mis en évidence. Enfin, plus de 49 000 polymorphismes de nucléotides simples (SNPs) et 2 700 séquences répétées simples (SSRs) ont été détectés.

En outre, la méthode *RNA seq* a été employée chez 4 stades larvaires des palourdes *Meretrix Meretrix* (Huan *et al.*, 2011). Un total de 704 671 reads a été obtenu par un pyroséquençage 454

et assemblé en 124 737 uniques séquences. Des termes GO ont été assignés aux séquences annotées et une analyse quantitative a été réalisée. Les transcrits présentant une forte variation d'expression de gène entre les 4 stades larvaires ont été mis en évidence et reliés au développement, à la croissance, à la formation de la coquille et aux réactions immunitaires. Plus récemment, un séquençage *de novo* du transcriptome de *Crassostrea angulata*, à partir de huit stades larvaires précoces du développement, a été réalisé en utilisant la technologie 454. Un total de 10 462 séquences assemblées a été obtenu. Comme l'indiquent les annotations par des termes GO et par les voies KEGG, ces transcrits couvrent diverses fonctions et processus biologiques (Qin *et al.*, 2012). Ces études ont permis d'enrichir la connaissance du développement larvaire des bivalves marins.

Récemment, des études ayant pour but d'identifier les gènes impliqués dans les défenses immunitaires et les réponses aux stress ont été publiées chez les bivalves. Un pyroséquençage 454 des hémocytes immuno-stimulés de *R. philippinarum* a été réalisé (Moreira *et al.*, 2012). 974 976 « reads » ont été obtenues et assemblées en 51 265 séquences. Les annotations ont révélé des membres potentiels de plusieurs voies et processus immunitaires tels que l'apoptose, la voie des récepteurs Toll et la cascade du système du complément. Le système immunitaire a aussi été étudié chez *M. edulis* : le transcriptome de différents tissus stimulés et stressés a été pyroséquéncé par la technologie 454. Plusieurs transcrits en relation avec l'immunité ont été identifiés tels qu'un répertoire complexe de PRRs, des cytokines dont des TNF et des membres des systèmes apoptotiques et autophagiques (Philipp *et al.*, 2012). De plus, l'étude du transcriptome de différents tissus de *C. gigas* par un séquençage Illumina révèle un vaste ensemble de transcrits répondant au stress environnemental. Le nombre important de transcrits codant pour des HSP70 et des inhibiteurs d'apoptose observé révèle probablement un rôle central dans l'adaptation des huîtres à leur vie sessile dans la zone intertidale très stressante (Zhang *et al.*, 2012).

I.4 Objectifs du travail de thèse

A- Contexte de l'étude

Ce travail est réalisé dans le cadre d'une étude sur le système immunitaire des bivalves, plus spécifiquement des moules bleues *Mytilus edulis*. Comme on l'a vu précédemment, la moule a une importance économique considérable, notamment sur l'Île du Prince Édouard et au Québec.

En conchyliculture, le potentiel de croissance et la résistance aux pathogènes des souches exploitées sont importants pour la rentabilité économique du secteur, sa pérennité et la qualité de ses produits. Notamment, l'élevage intensif des bivalves entraîne une concentration des organismes qui accroît le risque d'apparition et de transmission de maladies. Diverses maladies infectieuses causées par des bactéries, des protozoaires ou des virus ont déjà mis en péril de nombreuses espèces cultivées. Des facteurs biologiques (sensibilité accrue de l'hôte) et environnementaux (paramètres physico-chimique du milieu environnant) interagissent souvent pour entraîner l'apparition de ces mortalités chez les adultes (Tomuru *et al.*, 2001 ; Samain *et al.*, 2007) mais la présence de pathogènes a été observée pour de nombreux cas de mortalités estivales, qui pour certaines affectaient préférentiellement les jeunes individus (Friedman *et al.*, 1991 ; Gay *et al.*, 2004 a,b ; Burge *et al.*, 2007). De ce fait, l'étude des défenses immunitaires des bivalves d'intérêt commercial vise principalement à évaluer et comprendre leur sensibilité aux pathogènes. Dans plusieurs cas, il a été démontré que cette sensibilité varie d'une espèce à l'autre face à une même souche bactérienne (Oubella *et al.*, 1996 ; Bramble et Anderson, 1998 ; Allam et Ford, 2006) ou encore selon la souche bactérienne chez une même espèce de bivalve infectée (Oubella *et al.*, 1993). Cependant, bien que de plus en plus étudiées, les interactions entre hôtes et pathogènes et les défenses immunitaires chez les mollusques bivalves restent encore à élucider (Bachère *et al.*, 2004).

De plus, les bivalves, et en particulier *M. edulis*, sont souvent considérés comme des espèces sentinelles pour les programmes de mesures de la qualité de l'environnement. Ainsi, révéler les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le système de l'immunité innée des bivalves marins est essentiel pour l'aquaculture mais également pour les recherches scientifiques.

La relation de cause à effet entre la compétence immunitaire des bivalves et leur sensibilité aux infections nécessite, d'une part, la description des différentes composantes de leur système immunitaire et, d'autre part, la description de la réactivité et de la contribution de ces composantes en réponse à une infection bactérienne. Ainsi, le projet global s'inscrit dans un travail stratégique du CRSNG, pour lequel contribuent plusieurs laboratoires au Québec et en France. Le but consiste à comprendre l'ontologie du système immunitaire de *Mytilus edulis* et à identifier les acteurs moléculaires clés de son fonctionnement.

B- Objectifs spécifiques

Les objectifs qui m'ont été assignés dans ce projet sont de déterminer de façon la plus complète possible le transcriptome hémocytaire adulte et d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la réponse hémocytaire chez la moule bleue exposée à une souche bactérienne pathogène *Vibrio splendidus* LGP32.

Pour atteindre ces objectifs, un modèle d'infection *in vitro* a été mis en place en exposant des cultures d'hémocytes aux bactéries. Puis, 3 objectifs spécifiques ont été définis :

- 1- **Identifier le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus*.** Pour cela, une banque d'ADNc normalisée a été construite à partir des hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne. L'ensemble des séquences générées constituent un

transcriptome de référence pour d'autres analyses telles que les micropuces à ADN ou le *RNA-seq*.

- 2- **Étudier la cinétique des réponses immunitaires morphologiques et fonctionnelles au cours de l'infection bactérienne.** Un modèle *in vitro* d'interactions hémocytes-bactéries a été développé en exposant les hémocytes de *M. edulis* à 3 souches de *V. splendidus*. Les modifications phénotypiques (non-adhérence des cellules) et fonctionnelles (capacité de phagocytose et activation du stress oxydant) ont été suivies par microscopie et cytométrie en flux. Ces approches technologiques ont permis de relier les changements d'expression aux modifications phénotypiques que subissent séquentiellement les hémocytes.
- 3- **Étudier la cinétique des réponses moléculaires à grande échelle : quantification des niveaux de transcrits pendant l'infection bactérienne.** Dans un premier temps, à partir de la banque d'ADNc, un panel de 15.000 transcrits pertinents devait être sélectionné sur un total de 23.000 afin de constituer des puces à ADN. Après analyse, la sélection s'est avérée difficile en raison du grand nombre de transcrits potentiellement intéressants qui devaient être écartés. La « démocratisation » des technologies de séquençage de nouvelle génération et l'acquisition par le *Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill* de l'instrument *Illumina HiSeq 2000*, nous ont incités à abandonner la stratégie de mesure d'expression différentielle des transcrits par puces à ADN au profit de l'utilisation d'une approche par *RNA-Seq*. Contrairement aux puces à ADN (limitées à 15.000 points dans notre cas), la méthodologie *RNA-Seq* autorise l'analyse globale du transcriptome. Ainsi *RNA-Seq* a été conduite sur les hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne. Des acteurs moléculaires clés de la réponse immunitaire des hémocytes de *M. edulis* ont été identifiés.

Chapitre II

Détermination du transcriptome des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à *Vibrio splendidus*

Il s'agit de répondre au premier objectif de ce travail de thèse, à savoir l'identification du transcriptome hémocytaire de *Mytilus edulis* exposé à *Vibrio splendidus* LGP32, en particulier l'identification des transcrits relatifs à l'immunité chez *Mytilus edulis* à la suite d'une exposition bactérienne. Pour cela, une banque d'ADNc normalisée a été construite à partir des hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne. Cette banque a ensuite été séquencée par la technique de pyroséquençage 454, puis analysée grâce à des outils de bioinformatique. L'ensemble des séquences constitue un transcriptome référent pour étudier les niveaux de transcrits à l'aide d'analyses telles que les micropuces à ADN ou le *RNA-Seq*. Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication intitulée « *Sequence analysis of a normalized cDNA library of Mytilus edulis hemocytes exposed to Vibrio splendidus LGP32 strain* » (II. 2).

Avant de répondre à cet objectif, il nous fallait tout d'abord vérifier que les moules sur lesquelles nous travaillions correspondaient bien à l'espèce *M. edulis*. Nous souhaitions également examiner la validité du modèle biologique d'interaction hémocytes de moules/*Vibrio* en montrant que les souches bactériennes étaient capables d'induire une réponse moléculaire. Ceci fait l'objet d'une note (II. 1).

II.1 Note

A- *Mytilus edulis* ou *Mytilus trossulus*?

Sur les côtes du Canada Atlantique, deux espèces de moules coexistent : *M. edulis* et *M. trossulus* (Gosling 1992). Dans le Golfe du Saint Laurent, des populations pures de chacune de ces espèces sont abondamment retrouvées. Les moules de l'espèce *M. edulis* prédomine dans des zones de basse salinité et abritées, tandis que celles de l'espèce *M. trossulus* sont plus abondantes sur les côtes ouvertes exposées au vent et aux vagues (Moreau *et al.*, 2005). Ces moules ont une morphologie similaire, on ne peut donc pas les différencier de visu. Sur l'Ile du Prince Édouard, les populations de moules sont principalement de l'espèce *M. edulis* (Varvio *et al.*, 1988 ; Thomas *et al.*, 2002).

Afin de s'assurer que nous étions bien en présence de *M. edulis*, les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus de branchies des moules de nos études puis soumis à une transcription inverse. Une PCR a été réalisée en présence d'amorces spécifiques de *M. edulis*, de *M. trossulus* et communes aux deux espèces (*Figure 1*). Ces amorces amplifient sélectivement des transcrits mitochondriaux.

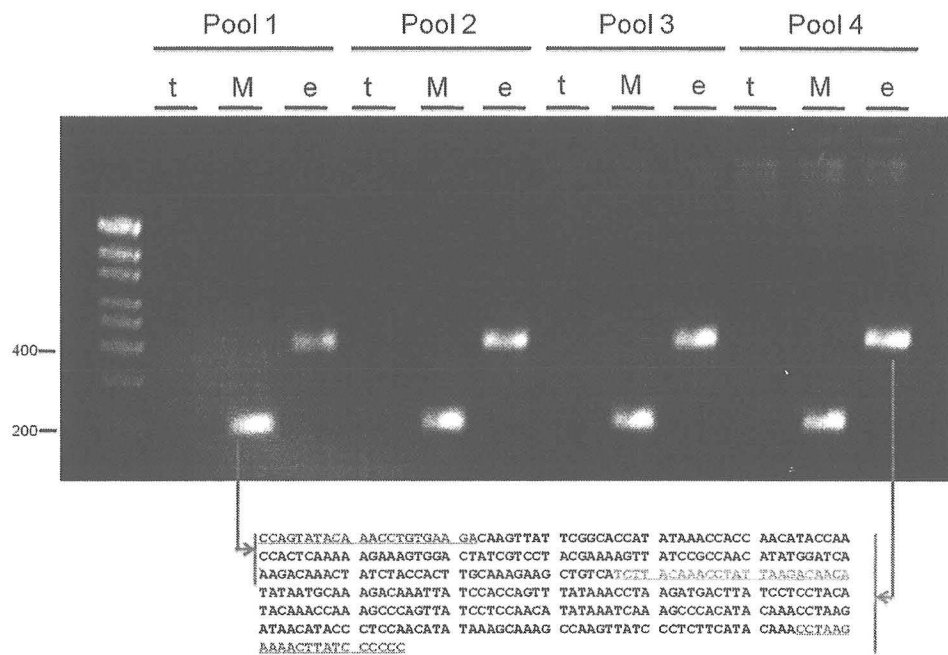


Figure 1 : PCR réalisée à partir d'amorces spécifiques de *M. trossulus* (t), communes aux deux espèces (M) et spécifiques de *M. edulis* (e). Chaque pool représente 20 animaux.

L'analyse révèle que les transcrits cibles de *M. edulis* et commun aux deux espèces sont amplifiés alors que le transcrit spécifiques à *M. trossulus* n'est pas amplifié (Figure 1). Ces résultats suggèrent que nous sommes bien en présence de l'espèce *M. edulis* dans notre étude.

B- Souche de *V. splendidus* LGP32 pathogène pour *M. edulis* ?

Afin de s'assurer que les bactéries *V. splendidus* souche LGP32 exercent un effet sur les hémocytes de moules et cela lors d'une exposition précoce des hémocytes aux bactéries, l'expression de gène codant pour la mytiline B, peptide antimicrobien connu pour jouer un rôle primordial dans la réponse immunitaire chez *M. edulis*, a été mesurée par qRT-PCR.

B.1 Infection bactérienne

Culture cellulaire primaire

L'hémolymph (un pool de 25 ml) a été prélevé du muscle adducteur chez *Mytilus edulis*. Puis, les hémocytes ont été mis en culture dans du milieu de croissance (glucose + FBS pour *Fetal Bovine Serum* + L.15) pendant 1 heure à 16°C. La viabilité des cellules a été vérifiée en utilisant la technique du bleu trypan.

Culture bactérienne

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *Vibrio splendidus* LGP32 et *Vibrio splendidus* LGP32 Δ_{vsm} , une souche dérivée dépourvue de métalloprotéinase. La souche LGP32 est reconnue pour être pathogène pour les mollusques bivalves. Les courbes de croissance de ces souches ont été analysées pour déterminer les phases exponentielles de croissance.

Exposition

Les hémocytes de *Mytilus edulis*, ont été mis en culture puis en présence avec *Vibrio splendidus* LGP32. Environ 1.5 millions de cellules ont été exposées à 4.5 millions de bactéries soit un ratio d'une cellule pour 3 bactéries. Les temps d'exposition sont : temps initial considéré comme

contrôle (0 heure), 2, 4 et 6 heures. De la même façon, un autre lot d'hémocytes a été mis en présence avec la souche LGP32 Δvsm .

B.2 PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

A chaque temps d'exposition, les ARN totaux ont été extraits puis l'ADNc a ensuite été synthétisé. La PCR quantitative en temps réel a été effectuée en utilisant le SYBR Green comme intercalant entre les deux brins de la molécule d'ADN. Pour la mesure de la cinétique de l'expression de la mytiline, une courbe standard a été générée à partir d'ajout de produit PCR de la mytiline purifiée (0.03 ng) à un échantillon d'ADNc. L'expression relative de la mytiline a été mesurée à 0, 2, 4 et 6 heures en normalisant au gène codant pour le facteur d'élongation EF1.

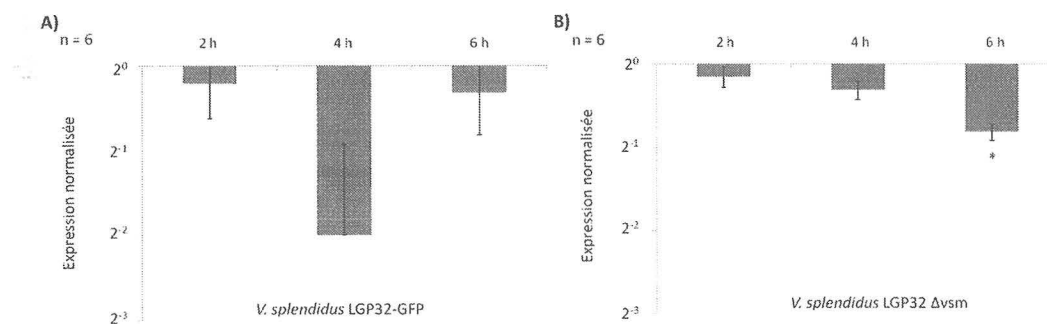


Figure 2 : Expression du gène codant pour la mytiline B à 2, 4 et 6 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32-GFP (A) et à *V. splendidus* LGP32 Δvsm (B) normalisée par rapport au contrôle (0 heure). * montre une différence significative ($p < 0.05$) entre contrôle et infecté (t-test).

Les résultats montrent une sous expression du gène codant pour la mytiline après 4 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32 et après 6 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32 Δvsm (Figure 2). Ils correspondent aux résultats retrouvés chez Cellura *et al.* (2007) et Li *et al.* (2010) qui montrent que ces souches exercent, dès 4 heures d'exposition, un effet sur la fonction

immunitaire des hémocytes. Les souches bactériennes utilisées induisent donc bien une réponse moléculaire de la part des hémocytes de *M. edulis*.

C- Conclusion

Cette étude préliminaire a permis de confirmer que nos échantillons de moules correspondaient effectivement à *M. edulis*. De plus, nos résultats démontrent bien une expression différentielle de la mytiline chez les hémocytes au cours des premières heures d'exposition à *V. splendidus*. Ces résultats ont été d'une importance capitale pour la suite de nos travaux.

II.2 Pyroséquençage de la banque d'ADNc normalisée des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à *Vibrio splendidus* LGP32

Publication 1: Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain.

Publiée dans « *Results in Immunology* »

Résumé

Durant les dernières décennies, les recherches sur les effets de bactéries pathogènes sur les systèmes de défenses immunitaires et les mortalités associées chez les bivalves marins ont augmenté progressivement. Pour se défendre contre les micro-organismes, les bivalves possèdent des défenses immunitaires innées orchestrées principalement par les hémocytes. Elles sont essentiellement basées sur les mécanismes de phagocytose et des réactions cytotoxiques. L'étude du transcriptome représente une étape primordiale dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le système immunitaire des moules *Mytilus edulis*. Étant donné que la connaissance du transcriptome chez *M. edulis* est encore très limitée, le séquençage d'une banque d'ADNc normalisée spécifique des hémocytes de *M. edulis* non exposés (contrôle) et exposés à la souche de *Vibrio splendidus* LGP32 pendant 2, 4 et 6 heures était primordiale pour ce travail de recherche.

Un total de 1 024 708 séquences de nucléotides (communément appelé « reads ») a été généré en utilisant le pyroséquençage 454. Ces « reads » ont été assemblés et annotés en 19 622 séquences qui couvrent probablement le transcriptome hémocytaires de *M. edulis*. Ces séquences ont été

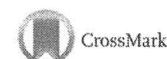
associées avec succès à des catégories de « *Gene Ontology* » (GO) à savoir des processus biologiques, des composants cellulaires et des fonctions moléculaires. Plusieurs transcrits relatifs à l'immunité et au stress tels que des protéines apparentées aux fibrinogènes (FREPs) et des récepteurs Toll (TLRs), le complément C1qDC, des enzymes anti-oxydantes et des peptides antimicrobiens ont été identifiés. De plus, la voie de signalisation des TLRs et les mécanismes associés aux lysosomes et à l'apoptose ont été comparés aux voies de référence KEGG.

Ce travail a permis de mettre en place une base de données de 19 622 uniques séquences nucléique annotées recouvrant probablement la majorité du transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus*. Ces séquences pourront être utilisées comme transcriptome de référence dans le but de quantifier les niveaux des transcrits avec des analyses à haut débit comme la technique *RNA-Seq*.

Mots clés : Transcriptome, hémocytes, *Mytilus edulis*, pyroséquençage 454, *Vibrio splendidus*



Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain



Marion Tanguy^{a,b,c}, Patty McKenna^c, Sophie Gauthier-Clerc^b, Jocelyne Pellerin^b, Jean-Michel Danger^{a,*}, Ahmed Siah^{c,d,**}

^aLaboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon, BP540, 76058 Le Havre, France

^bInstitute of Marine Science, University of Quebec at Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

^cDepartment of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College (AVC), University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, PE, Canada C1A 4P3

^dBritish Columbia Centre for Aquatic Health Sciences (BC CAHS), 871A Island Highway, Campbell River, BC, Canada V9W 2C2

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 December 2012

Received in revised form 12 April 2013

Accepted 16 April 2013

Keywords:

Transcriptome

Hemocyte

Mytilus edulis

454 Pyrosequencing

Vibrio splendidus

ABSTRACT

In the past decades, reports on bivalves' pathogens and associated mortalities have steadily increased. To face pathogenic micro-organisms, bivalves rely on innate defenses established in hemocytes which are essentially based on phagocytosis and cytotoxic reactions. As a step towards a better understanding of the molecular mechanisms involved in the mussel *Mytilus edulis* innate immune system, we constructed and sequenced a normalized cDNA library specific to *M. edulis* hemocytes unchallenged (control) and challenged with *Vibrio splendidus* LGP32 strain for 2, 4 and 6 h. A total of 1,024,708 nucleotide reads have been generated using 454 pyrosequencing. These reads have been assembled and annotated into 19,622 sequences which we believe cover most of the *M. edulis* hemocytes transcriptome. These sequences were successfully assigned to biological process, cellular component, and molecular function Gene Ontology (GO) categories. Several transcripts related to immunity and stress such as some fibrinogen related proteins and Toll-like receptors, the complement C1qDC, some antioxidant enzymes and antimicrobial peptides have already been identified. In addition, Toll-like receptors signaling pathways and the lysosome and apoptosis mechanisms were compared to KEGG reference pathways. As an attempt for large scale RNA sequencing, this study focuses on identifying and annotating transcripts from *M. edulis* hemocytes regulated during an *in vitro* experimental challenge with *V. splendidus*. The bioinformatic analysis provided a reference transcriptome, which could be used in studies aiming to quantify the level of transcripts using high-throughput analysis such as RNA-Seq.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. Open access under CC BY-NC-ND license.

1. Introduction

Bivalve mollusk culture is an important and rapidly expanding area of the world aquaculture production [1]. The blue mussel *Mytilus edulis*, tolerant to a wide range of environmental changes, combines a significant economic importance and a key role in bio-surveillance programs as a sentinel species in many areas of the world [2]. In the

past decades, reports on bivalves' pathogens and associated mortalities have steadily increased [3–5]. Among the opportunistic bacteria, members of the Gram-negative genus *Vibrio* are the most frequently isolated bacteria from mollusks. Several species belonging to this genus have been related with mortalities and diseases in larvae and juvenile individuals [6–11]. For example, the strain LGP32 has been associated with massive mortality events in the production of *Crassostrea gigas* oysters in France [12]. Recent studies have explored the route of infection and pathogenic processes of this strain [13]. A metalloprotease has been linked to toxicity [14,15] and the outer membrane protein (OMP) OmpU has recently been shown to be pivotal to LGP32 virulence [13,16].

To face pathogenic micro-organisms, bivalves rely on innate defenses triggered by hemocytes which are essentially based on phagocytosis and cytotoxic reactions. Innate defenses are able to recognize unique and characteristic molecules present at the surface of microorganisms, such as lipopolysaccharides (Gram negative bacteria) or peptidoglycans (Gram positive bacteria), known as pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Indeed, hemocytes recognize PAMP through lectins, and membrane bound receptors, like Toll-like

* Corresponding author. Jean-Michel Danger, PhD, Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon, BP540, 76058 Le Havre, France. Tel.: +33 2 32 74 43 02; fax: +33 2 32 74 43 14.

** Corresponding author at: British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences (BC CAHS), 871A Island Highway, V9W 2C2, Campbell River, BC, Canada. Tel.: +1 250 286 6102; fax: +1 250 286 6103.

E-mail addresses: jean-michel.danger@univ-lehavre.fr (J.-M. Danger), ahmed.siah@cahs-bc.ca (A. Siah).

receptors, which are referred to as pathogen recognition receptors (PRR) [17]. Different types of lectins (C-type lectin, sialic acid binding lectin, fucoselectin and galectin) have been characterized in *M. galloprovincialis* [18]. The diversity of C-type lectin sequences may answer to the variety of pathogens. Therefore, C-type lectins are considered as PRR by some authors [19–21]. In addition, Toll-like receptors have already been identified in various bivalves [22–25] included in *Mytilus* species [20,26]. Activation of Toll-like receptor pathways is essential for inducing immune related-gene expression in the defense against bacterial infections in invertebrates [27].

For an efficient defense mechanism, both cellular and humoral processes are involved in a coordinated way. In contact with bacteria, hemocytes first phagocytose the invaders and then degrade them by stimulating their phagolysosomal activities. Associated with the phagocytic activity, the NADPH oxidase as well as nitric oxide (NO) synthase are activated, thus leading to the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl radical (OH^\cdot) or singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and the production of NO enabling the oxidation of the foreign invaders [28–32]. In parallel, the antimicrobial peptides (AMPs) involved in innate immunity are synthesized and released in the hemolymph. These humoral molecules, known as cysteine-rich peptides, can destroy bacteria by destabilizing their membrane permeability [33]. In *Drosophila* and shrimps, the AMP-encoding genes are regulated by the Toll and *Immune deficiency* (Imd) pathways [34,35]. In mussels, four groups of AMPs (defensins, mytilins, myticins and mytimycins), which play a key role in immune defense, have been identified and characterized [36]. These AMPs have specific and complementary antimicrobial activities. Defensins and myticins are more active against Gram-positive bacteria than against the Gram-negative ones. Mytimycins are exclusively antifungal [37]. On the other hand, mytilins act both on Gram-negative and Gram-positive bacteria, including vibrios [36,38].

In the last years, host-pathogen interaction models in aquatic species have gained more popularity since they constitute useful tools for understanding the pathogenicity of diseases in cultured and wild populations [20,39–43].

Several studies have focused on the molecular mechanisms involved in the response of hemocytes to *V. splendidus* LGP32 strain. Differential gene expression levels associated with immune responses such as AMPs, lysozyme and antioxidant enzymes genes were found in *M. galloprovincialis* and *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 [20,40,41,43]. Also, differentially expressed immune genes such as ficolin, killer cell lectin-like receptor, TLR-2, mitogen-activated protein kinases (MAPK), ferritin, heat shock proteins 90 (HSP90) and cathepsin have been observed in *Mya arenaria* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 [22,39]. These studies demonstrated that *V. splendidus* LGP32 has the ability to regulate the expression of the genes involved in innate immunity of bivalve mollusks during the first hours of bacterial challenge.

Knowledge of the transcriptome has been developed in the last decade: the sequence data available for bivalve species have been steadily growing, especially through EST collections [18,44] and pyrosequencing [23,26,45–48]. To date, approximately 369,093 ESTs, 55,541 proteins and 921 genes from the class Bivalvia have been inventoried in public databases. However, only a few thousand EST sequences are related to *M. edulis* [26,49,50] and *M. galloprovincialis* [18,20,47,51].

Unraveling molecular mechanisms involved in innate immune system of marine bivalves is essential for both scientific research and aquaculture. These processes will be more readily addressed when the hemocyte transcriptome of *Mytilus* species is available. The main focus of this study was to generate a cDNA sequences library specific to *M. edulis* hemocytes challenged with *V. splendidus* LGP32 strain with a short term exposure (0–6 h). These sequences will be available as a reference transcriptome for further high-throughput analysis such as RNA-Seq or microarrays.

2. Materials and methods

2.1. Mussels and hemolymph collection

Blue mussels, *M. edulis* (3–5 cm in shell length) were sampled from wild population in Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada). Mussels were kept and maintained in a 300 L tank with recirculating artificial seawater (Instant Ocean[®]) at a temperature of 16–17 °C and a salinity of 30 ppt. Animals were fed daily with Spat Formula (Innovative Aquaculture Products Ltd., Canada).

Hemolymph was withdrawn from the adductor muscle using 3 mL syringes fitted with 25 gauge needles. The hemolymph quality of individual mussels was checked using an inverted microscope (ZEISS, Germany). Hemolymph was pooled into a sterilized 30 mL tube and cell concentration in hemolymph was determined using a hemocytometer. Only hemocytes with prolonged pseudopodia were kept for further analysis.

2.2. In vitro hemocyte challenge

One million hemocytes were added to each well of 24 well plates previously filled with 1 mL of L-15 growth media (Leibovitz L-15 medium (Sigma, ON, Canada)). The L-15 was slightly modified by the addition of 20.2 g/L NaCl, 0.54 g/L KCl, 0.6 g/L CaCl_2 , 1 g/L MgSO_4 , 83 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10% of glucose and 10% of heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS). Primary cell culture was incubated for 1 h at 16 °C so that hemocytes were able to adhere to the bottom of the wells. Cell viability was assessed using the Trypan blue exclusion method.

Bacteria were cultured overnight to reach exponential growth phase in Trypticase Soy Broth (TSB, BD-BactoTM) supplemented with 2% NaCl at 16 °C in 250 mL Erlenmeyer flasks and shaken at 100 rpm. The bacterial concentration was determined using a spectrophotometer (UNICO Spectrophotometer, Biotech, Inc., Québec, Canada) at 540 nm. Bacteria were added to hemocytes at a (1:3) hemocyte:bacteria ratio. Controls represent hemocytes incubated in L-15 media without bacteria. Hemocytes were exposed to bacteria for 2, 4 and 6 h. For each exposure time, 6 replicates were performed and cell viability was assayed by using the Trypan blue exclusion technique. More than 90% of the hemocytes were viable before RNA extraction (data not shown).

2.3. RNA extraction, cDNA library and 454 pyrosequencing

2.3.1. RNA extraction

For each exposure time, total RNA from hemocytes was extracted using a Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, ON, Canada). RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, DE, US) and RNA quality was assessed using the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad Ltd. ON, Canada). Then, RNA from the control and challenged hemocytes (2, 4 and 6 h) was pooled to achieve 5 µg of total RNA necessary for cDNA library synthesis.

2.3.2. cDNA synthesis and PCR amplification

cDNA synthesis was carried out by Clontech Inc. (CA, US) and performed using SMART PCR kit (Clontech Inc. CA, US). Briefly, first strand cDNA synthesis was performed using primer annealing mixture (5 µL) containing 0.3 µg of total RNA; 10 pmol SMART-Sfi1A oligonucleotide (5'-aagcagtgtgtatcaacgcagagtgccattacggccgrgrg-3'); 10 pmol CDS-Sfi1B primer (5'-aagcagtgtgtatcaacgcagagtgccgagggcgcccd(T)20-3'). The reaction mixture was heated at 72 °C for 2 min and cooled on ice for 2 min. First-strand cDNA synthesis was then initiated by mixing the annealed primer-RNA with Reverse Transcriptase in a final volume of 10 µL, containing 1 × First-Strand Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3); 75 mM KCl; 6 mM MgCl_2); 2 mM DTT; 1 mM of each dNTP.

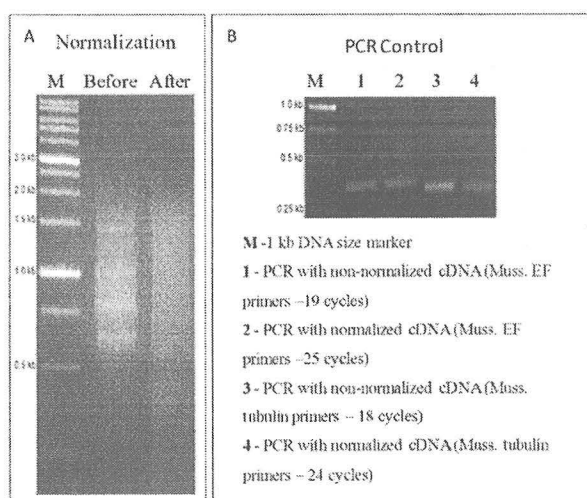


Fig. 1. (A) cDNA profile before and after normalization; (B) PCR Control after normalization. Following extraction and quality control, RNA from the control and challenged hemocytes (2, 4 and 6 h) were pooled before conducting cDNA first strand synthesis. cDNA normalization was performed by Clontech Inc. CA, US using duplex-Specific Nuclease (DSN) treatment. Electrophoresis profiles were compared before (A, before) and after cDNA normalization (A, after). Following normalization, all major bands disappeared. To further control normalization, cDNAs to Elongation Factor alpha (EF) and tubulin were PCR-amplified with different cycle numbers and amplification products were compared. M: molecular size markers.

The first-strand cDNA synthesis reaction was incubated at 42 °C for 2 h in an air incubator and then cooled on ice.

Then, first-strand cDNA was diluted 5 times with TE buffer, heated at 70 °C for 7 min and used for amplification by Long-Distance PCR. PCR reaction (50 µL) was performed using 1 µL diluted first-strand cDNA; 1 × Advantage 2 reaction buffer; 200 µM dNTPs; 0.3 µM SMART PCR primer (5-aagcagtggatcaacgcagagt-3'); 1 × Advantage 2 Polymerize mix. The PCR conditions were: initiation at 95 °C for 7 s; annealing at 66 °C for 20 s and extension at 72 °C for 3 min, 19 cycles. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., CA, US) and concentrated using ethanol precipitation. DNA pellet was diluted in ultrapure water to a final cDNA concentration of 50 ng/µL.

2.3.3. cDNA normalization and duplex-specific nuclease (DSN) treatment

Hybridization reaction was performed using 3 µL (about 150 ng) purified ds cDNA and 1 µL of 4 × Hybridization Buffer (200 mM HEPES-HCl, pH 8.0; 2 M NaCl). The reaction mixture was overlaid with one drop of mineral oil and incubated as follows: 98 °C for 3 min and 68 °C for 5 h.

The following preheated reagents were added to the hybridization reaction at 68 °C: 3.5 µL ultrapure water; 1 µL of 5 × DNase buffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT); 0.5 µL DSN enzyme. Then, incubation was extended at 67 °C for 20 min. On completion of DSN treatment, the DSN enzyme was inactivated by heating at 97 °C for 5 min.

2.3.4. Amplification of normalized cDNA and 454 pyrosequencing

cDNA sample was diluted by adding 30 µL ultrapure water and used for PCR amplification. PCR reaction (50 µL) contained: 1 µL diluted cDNA; 1 × Advantage 2 reaction buffer; 200 µM dNTPs; 0.3 µM SMART PCR primer; 1 × Advantage 2 Polymerize mix. PCR was carried out on MJ Research PTC-200 DNA Thermal Cycler (GMI Inc., MI, US). Eighteen PCR reaction cycles were performed as follows: 95 °C for 7 s; 65 °C for 20 s; 72 °C for 3 min. Roche GS-FLX 454 pyrosequencing was conducted by Genome Quebec at McGill University (Montreal,

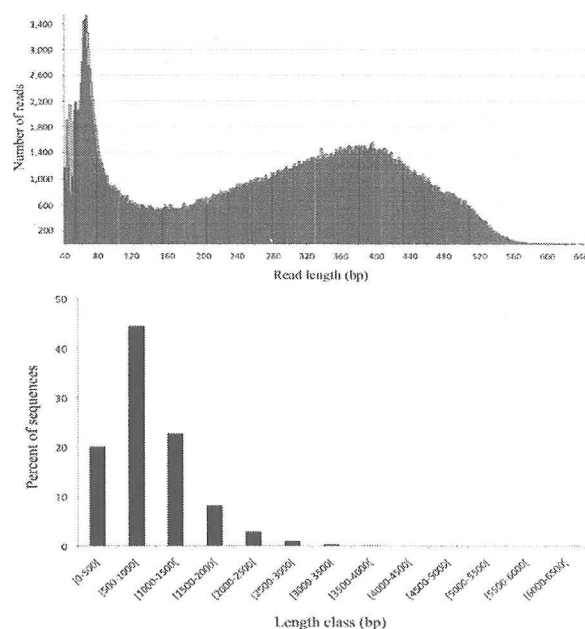


Fig. 2. (A) lengths distribution of all reads generated and (B) lengths distribution of the assembled sequences. A total of 1,024,708 reads were generated by 454 sequencing with a mean sequence length of 256 pb (histogram A plotting number of reads per read length). Following Newbler assembly, 19,622 sequences with an average length of 925 bp were generated, most of them (44%) ranged between 500 and 1000 bp in length (histogram B plotting percent of sequence in function of transcripts size ranges).

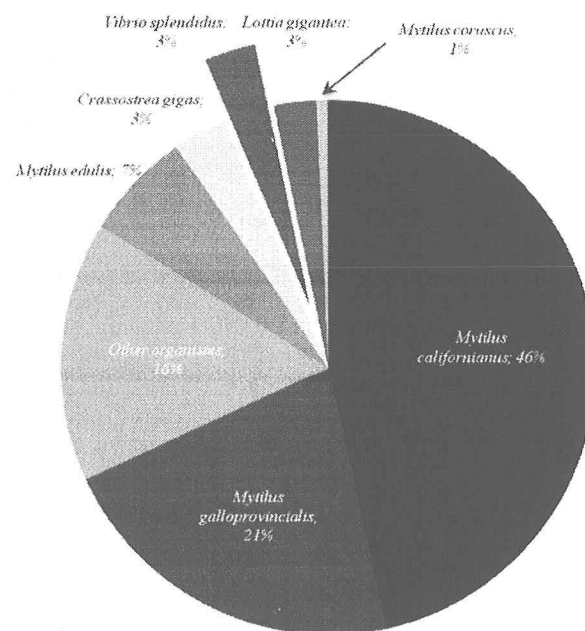


Fig. 3. Organisms that match to the assembled sequences of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32. Percentage of transcripts finding similarity with various species in the non-redundant sequence databases (Megablast program against nucleic acids).

Canada).

2.4. Data analysis

Raw data generated from 454 sequencing were assembled by Genome Quebec. Adaptors and primer sequences were trimmed

and low quality sequences were discarded. *De novo* sequence assembly was performed using Newbler program. The generated contigs and isotigs were blasted against non-redundant (nr) sequence databases (National Centre for Biotechnology Information (Bethesda, USA), NCBI) using the Megablast program at Genomequest (USA). Sequences were also blasted against protein databases (Genpept, Translated Genbank, Protein Data Bank, RefSeq, Swiss-Prot and Translated EMBL), by using BlastX program. The 5 best hits were kept and *e*-value cut-off of 10^{-3} was applied by default. Gene ontology searches were performed on the slim GO terms using Amigo program. Sequences were submitted to BLAST comparison against the KEGG GENES database to obtain KO (KEGG Orthology) assignments and to generate KEGG pathways. The threshold >60 is applied to BLAST bit scores.

3. Results and discussion

3.1. Normalized cDNA library

During the last decade, numerous studies have been undertaken to better understand the molecular mechanisms of responses of hemocytes challenged with *V. splendidus*. In this context, the new generation of sequencing technologies represents an unprecedented opportunity to identify a wide range of molecular actors, as well as to unravel the molecular mechanisms involved in this process. A normalized cDNA library is a very relevant tool for mussel transcriptomics and can be further exploited as an effective source of novel mRNAs [18].

In this study, RNA was extracted from hemocytes of *M. edulis* unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain for 2, 4 and 6 h. Then, the total RNA samples were pooled and a normalized cDNA library was produced by equilibrating the final representation of abundant and rare transcripts. This strategy was adopted in order to enhance the probability of regulated transcripts during short-term infection by *Vibrio* to be represented. Quality control of the normalization step was conducted by agarose gel electrophoresis and by PCR amplification of elongation factor 1 alpha (EF1- α) and tubulin transcripts (Fig. 1). As expected, before normalization, some transcripts were highly expressed, whereas, after normalization, only a smear was observed on the gel indicating an equalization of transcript levels (Fig. 1A). Consequently, the probability to sequence several times the same sequence is decreased and the probability to sequence rare transcripts is increased. PCR controls were then carried out to analyze the quality of the normalization process. Abundant transcripts such as EF1- α and tubulin were used as a control. Bands of the targeted transcripts EF1- α and tubulin were observed before and after normalization. After normalization, amplification of the targeted cDNA needed more cycles (25 and 24 cycles for EF1- α and tubulin respectively) in comparison to non-normalized library (19 and 18 cycles for EF1- α and tubulin respectively) showing a decrease of their abundance (Fig. 1B).

3.2. Pyrosequencing and assembly

The normalized cDNA library from hemocytes of *M. edulis* exposed to *V. splendidus* LGP32 was pyrosequenced on a Roche GS-FLX 454 sequencing apparatus by using the Titanium chemistry. A total of 1,024,708 nucleotide reads was generated with an average length of 265 bp. The longest and shortest reads were 660 bp and less than 50 bp long, respectively (Fig. 2A). Most of the reads ranged between 360 and 420 bp.

The different steps for the sequences analysis all was performed using the Genomequest bioinformatic platform or at genome Quebec (<http://gqinnovationcenter.com/>). A trimming step was conducted to remove adaptors, primers and low quality sequences. Then, reads were submitted for assembly using Newbler program, generating

19,622 sequences which included 148 contigs and 19,474 isotigs. The average length was 925 bp. The length of the sequences varied from 3 to 6,371 bp. Most sequences (44%) were ranging between 500 and 1000 bp. Length distribution of the sequences is shown in Fig. 2B.

To examine the coverage of the generated contigs and isotigs, a similarity research on non-redundant (nr) nucleotide sequence databases (National Centre for Biotechnology Information (Bethesda, USA), NCBI) was performed using Megablast. A total of 65,832 hits was obtained and covered 748 different organisms. Among the best hits, 49,471 (75%) matched with *Mytilus* species (46% *M. californianus*; 21% *M. galloprovincialis*, 7% *M. edulis* and 1% *M. coruscus*) (Fig. 3). As anticipated, several sequences likely corresponded to *Vibrio* sp or to *Vibrio splendidus* (3.1%). Interestingly, some sequences had best blast hits with *Ciona intestinalis* cDNAs. The aquaculture industry in Prince Edward Island, where the mussels were collected, faces an invasion issue with this species. In some areas of the island, production problems, including handling difficulties and resource competition with the cultured blue mussel *Mytilus edulis* has been observed [52]. Mussel could filter and accumulate *C. intestinalis* larvae which could explain the identification of sequences with high homology with *C. intestinalis*.

For a number of sequences, the match between our assembled transcripts and sequences listed in Genbank was perfect. This was in particular the case for *Mytilus* species (262 perfect matches) and for *Vibrio splendidus* LGP32 strain (255 perfect matches), suggesting a good accuracy and quality of sequencing and assembly.

3.3. Annotation

For annotation, nucleotide sequences of contigs and isotigs were also blasted against protein databases using the Megasearch program in the 6 frames. A score cut-off of 30 was applied and results were limited to 5 per query. A total of 19,793 hits were obtained, but in the end, only the very best hit for each query sequence was kept. For these 4198 selected best hits, the resulting E values ranged from 3.2 to 0. A total of 4146 of these best hits had an *e*-value lower than 10^{-5} . The very best similarity was obtained with UniProtKB/TREMBL accession number COZ203 which corresponds to *Mytilus galloprovincialis* hsp90. The corresponding alignment was 664 aminoacids in length, the Megasearch score was 3383 and residue identity equaled 98.8%. Again, some of the best hits did correspond to *Vibrio splendidus* protein sequences, which is consistent with megasearches conducted at the nucleotide level.

The genome size of *Mytilus* is estimated to be 1.56×10^9 bp (<http://www.genomesize.com/>). Therefore, a simplistic guess on the number of genes would be about 15,000 assuming that the genome does not contain a particularly high proportion of sequence repeats [47]. Expressed sequence tag collections from *M. galloprovincialis* tissues represent around 7000 non-redundant sequences [47]. On this basis, we assume that the set of 19,622 sequences we isolated is likely to cover the major part of *M. edulis* hemocytes transcriptome, even though some sequences are very likely to be related to *Vibrio* and to a lesser extent to *Ciona*.

3.4. Gene ontology analysis

Gene ontology (GO) has been widely used to perform gene classification and functional annotation using controlled vocabulary and hierarchy including molecular function, biological process and cellular components [53]. Gene ontology (GO) analysis was conducted using Amigo (<http://amigo.geneontology.org/>). Go slim is a cut down version of the GO containing a subset of the terms of the whole Gene ontology. These slim annotations give a broad overview of the ontology content without the details of the specific fine grained terms. The sequences were successfully assigned to biological process, cellular

component, and molecular function GO categories. Distributions of the GO term for the three categories are shown in Table 1.

For biological process category, the most abundant terms were “metabolic process” (GO:0008152, 77.9%) and “cellular process” (GO:0009987, 68.7%), followed by “small molecule metabolic process” (GO:0044281, 19.9%), “transport” (GO:0006810, 7%), “cellular macromolecule biosynthetic process” (GO:0034645, 19.5%) and “gene expression” (GO:0010467, 17.8%).

Furthermore, for the cellular component GO the most evident matches were within the “cell part” (GO:0044464, 91.6%) and “intracellular” (GO:0005622, 54%) terms, followed by “membrane” (GO:0016020, 48.9%) and “intracellular part” (GO:0044424, 45.7%). There were also “cytoplasm” (GO:0005737, 37.5%), “cytoplasmic part” (GO:0044444, 21.5%) and “intracellular membrane-bounded organelle” (GO:0043231, 20.2%).

Finally, the matches of molecular function terms were most prevalent within the “catalytic activity” (GO:0003824, 66.8%), the “binding” (GO:0005488, 60.3%), the “nucleic acid binding” (GO:0003676, 21.7%), the “hydrolase activity” (GO:0016787, 21.1%) and “transferase activity” (GO:0016740, 20.2%). In other studies with various bivalve species, from different tissues ESTs, authors globally found these same dominant Go slim terms [18,45,48].

3.5. Identification of immune related sequences in *M. edulis* hemocytes

The cellular immune system is linked to competent cells, referred to hemocytes which are the circulatory cells of molluscs. They have various known functions including digestion, transport of nutrients, formation and mending of the shell, repair of wounds, excretion and internal defense [54,55]. Several transcripts related to immunity and stress were identified in our cDNA library.

3.5.1. Pathogen recognition

The initial step of the immune responses is the detection and recognition of foreign invaders by hemocytes. Different proteins and receptors, such as lectins, Toll-like receptors (TLRs) and peptidoglycan recognition receptors (PGRPs), have been reported to be involved in pathogens recognition on the cellular surface [20,23,26,56].

Lectins are a large group of carbohydrate-recognition proteins with a high structural diversity. They have the ability to recognize carbohydrates endogenous to the animal or presented by microbial invaders and can be found in soluble and membrane associated forms. In this way, they play crucial roles in multi-process of host immune responses, such as pathogen recognition, immune signaling transduction, cellular adhesion and inflammation [57].

Different types of lectins (C-type lectin, sialic acid binding lectin, fucoselectin and galectin) have been characterized in *M. galloprovincialis* [18,20]. In *M. edulis* transcriptome, after applying BlastX, we found only 4 transcripts homologous to galectins, and 34 homologous to Fibrinogen-related protein (FREPs-1, -2, -4, -5, -6 and undefined). Galectins are characterized by a conserved sequence motif in their carbohydrate recognition domain and a specific affinity for β -galactosides. Fibrinogen-related proteins (FREPs) contain in the C-terminal portion fibrinogen-like domains but differ in the N-terminal region. Many members of this family play important roles as pattern recognition receptors in innate immune responses [58]. In *M. edulis*, there is a very diverse set of FREP sequences among and within individuals suggesting the capacity to recognize and eliminate different kinds of pathogens [56].

The Toll-like receptor (TLR) signaling pathway is an ancient pathway. It depends on specific families of pattern recognition receptors responsible for detecting microbial pathogens on the cellular surface and generating innate immune responses [59]. A total of 22 KO (KEGG Orthology) were associated with this pathway. TLRs are characterized by N-terminal leucine-rich repeats (LRRs) and a transmembrane region followed by a cytoplasmic Toll/IL-1R homology (TIR) domain

[59]. A single TLR was identified in previous studies in *Chlamys farreri* (CfToll-1), *Mya arenaria* (TLR-2) and *Crassostrea gigas* (CgToll-1) [22,24,25] and 2 transcripts in *Mytilus galloprovincialis* [20]. More recently, TLR-2, 6 and 13 were detected by pyrosequencing of *Ruditapes philippinarum* hemocytes [23] and 27 putative TLR were identified in *Mytilus edulis* transcriptome [26]. Some transcripts represented in the normalized cDNA library had high similarities with TLR-1, 2, 6, 4 and 3. TLR-2 forms a heterodimer with either TLR-1 or TLR-6 which allows various pathogens such as bacteria, mycoplasma, fungi and viruses to be identified [59]. TLR-4 recognizes lipopolysaccharide (LPS) together with myeloid differentiation factor 2 (MD2) on the cell surface. However, no MD2 in the *M. edulis* transcriptome was detected. TLR3 detects viral double-stranded (ds) RNA in the endolysosome.

Fig. 4 shows the TLR signaling pathway with the corresponding molecules found in the *M. edulis* transcriptome compared to the KEGG reference pathway. In vertebrates, TLR signaling pathways are separated into two groups: a MyD88-dependent pathway that leads to the production of pro-inflammatory cytokines with quick activation of NF- κ B and MAPK, and a MyD88-independent pathway associated with the induction of IFN- β and IFN-inducible genes, and a slow activation of NF- κ B and MAPK. Many components of the MyD88 dependent TLR pathway are found such as MyD88, IRAK-4, TRAF-6 and more (Fig. 4). Fewer components are found in a MyD88-independent pathway, which is in accordance with Philipp et al. [26].

Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) are conserved from insects to mammals and recognize bacteria and their major cell wall component, peptidoglycan [60]. In bivalves, PGRPs have been identified in the scallops *A. irradians* and *C. farreri*, the clams *R. philippinarum* and *S. grandis* and the oyster *C. gigas* [23,61–64]. To our knowledge, PGRPs have not been identified yet in *Mytilus* species. Following BlastX, a transcript was identified as homologous to PGRP S1S from *C. gigas* (57% identity with *E* value = $6.26e^{-83}$).

Also, 99 transcripts with homologies with the complement C1q were present in our library. The C1q domain-containing (C1qDC) proteins constitute a family of proteins characterized by a globular C1q (gC1q) domain in their C-terminus. In vertebrates, they are involved in various cellular processes and are considered as major effector arms in immune responses as a key bridge between innate and adaptive immunity [65,66]. Some complement-like factors have also been identified in various bivalves [67,68] including in *Mytilus* species [20,69,70] and are involved in the recognition of invading microorganisms probably as pattern recognition molecules. In *M. galloprovincialis* hemocytes, both Gram-positive (*Micrococcus lysodeikticus*) and Gram-negative (*V. anguillarum*) bacteria lead to an increase in C1qDC transcript levels [69,70].

No cytokines-like sequence were identified. This would indicate that the corresponding transcripts are present at relatively low levels in *M. edulis*, or alternately these sequences have reduced similarities with orthologs listed in bioinformatics data banks. However, TNF- α receptor and IL-1 receptor associated kinase 4 were represented.

3.5.2. Phagocytosis and mechanisms involved

After recognition and chemotactic migration of hemocytes towards invading pathogens and following attachment and endocytosis of pathogens [71], hemocytes phagocytose and kill these invaders by producing lysozymes, antimicrobial peptides (AMPs) and toxic radicals.

During the phagocytosis process, phagosomes formed progressively acquire digestive characteristics. This maturation of phagosomes involves a regulated interaction with the other membrane organelles, including recycling endosomes, late endosomes and lysosomes [72]. In the cDNA library, 38 KO were associated with the phagosome (data not shown). After the fusion of phagosomes and lysosomes, toxic products were released which permit to kill most bacteria and degrade them into fragments. Phagolysosome contains

Table 1

Distribution of the Gene ontology terms (Go slim) of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* annotated sequences. The sequences have been classified in Biological Process (I), Cellular component (II) and Molecular function (III). Because one sequence can be assigned to more than one GO term, the percentage of all terms is larger than 100%.

Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
I. Biological process			
Metabolic process	77.89	Establishment of localization in cell	1.32
Cellular process	68.62	Locomotion	1.31
Cellular biosynthetic process	29.66	Multicellular organismal process	1.25
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	28.64	Anatomical structure development	1.21
Small molecule metabolic process	19.81	Cellular component assembly at cellular level	1.14
Transport	19.70	Sulfur compound metabolic process	1.08
Cellular macromolecule biosynthetic process	19.50	Protein folding	0.96
Gene expression	17.85	Homeostatic process	0.93
Regulation of biological process	14.45	Cell death	0.87
RNA metabolic process	14.18	Organelle organization	0.79
Regulation of cellular process	13.89	Intracellular transport	0.77
Response to stimulus	10.63	Ribosome biogenesis	0.77
Cellular protein metabolic process	9.95	Cellular component morphogenesis	0.75
Generation of precursor metabolites and energy	7.61	Multicellular organismal development	0.74
Cellular response to stimulus	7.17	Cell morphogenesis	0.74
Cellular ketone metabolic process	7.07	Cellular macromolecular complex assembly	0.70
DNA metabolic process	6.94	Immune system process	0.65
Carboxylic acid metabolic process	6.84	mRNA processing	0.61
Carbohydrate metabolic process	6.77	Cellular protein localization	0.60
Cellular catabolic process	5.74	Protein complex assembly	0.57
Macromolecule modification	5.48	Intracellular protein transport	0.53
Cellular amino acid metabolic process	5.39	Cellular component movement	0.50
Signaling	5.10	Cell motility	0.47
Signal transduction	5.04	Neurological system process	0.42
Translation	4.88	Chromosome organization	0.41
Response to stress	4.44	Cell differentiation	0.36
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid catabolic process	3.93	Vesicle-mediated transport	0.30
Protein modification process	3.89	Protein targeting	0.27
Interspecies interaction between organisms	3.72	Nucleocytoplasmic transport	0.21
Cellular component organization	3.52	Cellular membrane organization	0.20
Cofactor metabolic process	3.43	Cytoskeleton organization	0.18
Reproduction	2.75	Growth	0.17
Lipid metabolic process	2.69	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	0.16
ncRNA metabolic process	2.62	Cell proliferation	0.13
RNA processing	2.52	Cell cycle phase	0.13
Macromolecule localization	2.17	Mitotic cell cycle	0.11
tRNA metabolic process	2.03	M phase	0.10
Cellular component organization at cellular level	1.90	Cell-cell signaling	0.09
Regulation of biological quality	1.82	Mitochondrion organization	0.04
Protein transport	1.64	Ribonucleoprotein complex assembly	0.04
Symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	1.55	Circulatory system process	0.03
Cellular localization	1.40	Cell junction organization	0.01
II. Cellular component			
Cell part	91.55	Cell projection	1.59
Intracellular	54.00	Chromosome	1.37
Membrane	48.90	Cytoskeleton	1.02
Intracellular part	45.66	Nuclear part	0.87
Cytoplasm	37.50	Endomembrane system	0.81
Cytoplasmic part	21.51	Cytoskeletal part	0.77
Intracellular membrane-bounded organelle	20.19	Cytosol	0.75
macromolecular complex	13.14	Endoplasmic reticulum	0.70
Intracellular organelle part	12.09	Microtubule cytoskeleton	0.55
Mitochondrion	10.62	Golgi apparatus	0.37
Plasma membrane	10.26	Nucleoplasm	0.35
Intracellular non-membrane-bounded organelle	8.16	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle	0.23
Protein complex	7.75	Nucleolus	0.20
Organelle envelope	7.50	Nuclear chromosome	0.15
Extracellular region	7.22	Endosome	0.08
Ribonucleoprotein complex	5.09	Microtubule organizing center	0.08
Nucleus	4.77	Cilium	0.03
III. Molecular functions			
Catalytic activity	66.79	Ligase activity	3.47
Binding	60.27	Protein binding	2.81
Nucleic acid binding	21.68	Isomerase activity	2.59
Hydrolase activity	21.09	Methyltransferase activity	2.40
Transferase activity	20.18	Transferase activity, transferring acyl groups	2.29
Ion binding	17.90	Hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	1.51
Oxidoreductase activity	16.62	Helicase activity	1.27
DNA binding	11.89	Translation factor activity, nucleic acid binding	0.95
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	9.93	GTPase activity	0.88
RNA binding	7.60	Phosphatase activity	0.83
Structural molecule activity	5.02	Enzyme regulator activity	0.68
Peptidase activity	4.66	Protein transporter activity	0.60
Nucleic acid binding transcription factor activity	4.64	Protein binding transcription factor activity	0.50
Nucleotidyltransferase activity	4.58	Transcription factor binding	0.24
Kinase activity	4.57	Cytoskeletal protein binding	0.18
ATPase activity	4.39	Enzyme binding	0.15

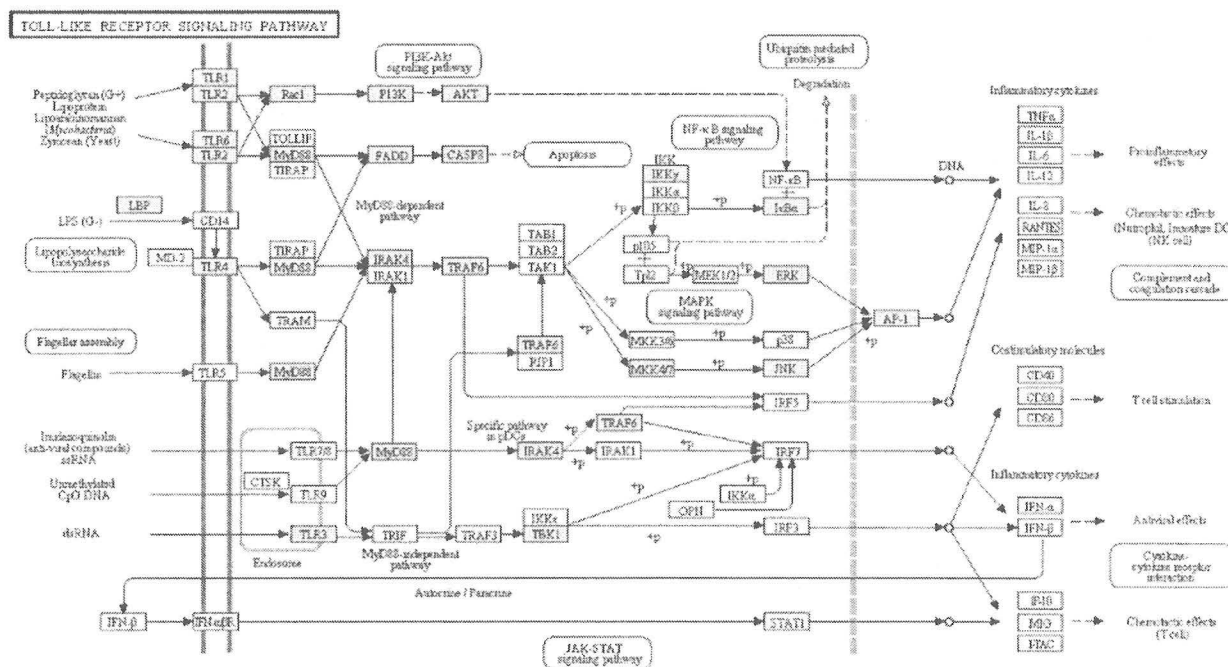


Fig. 4. Schematic comparison of *Mytilus* and KEGG reference TLR pathway members. Shaded boxes indicate proteins identified in our 454 results and white boxes the absent ones.

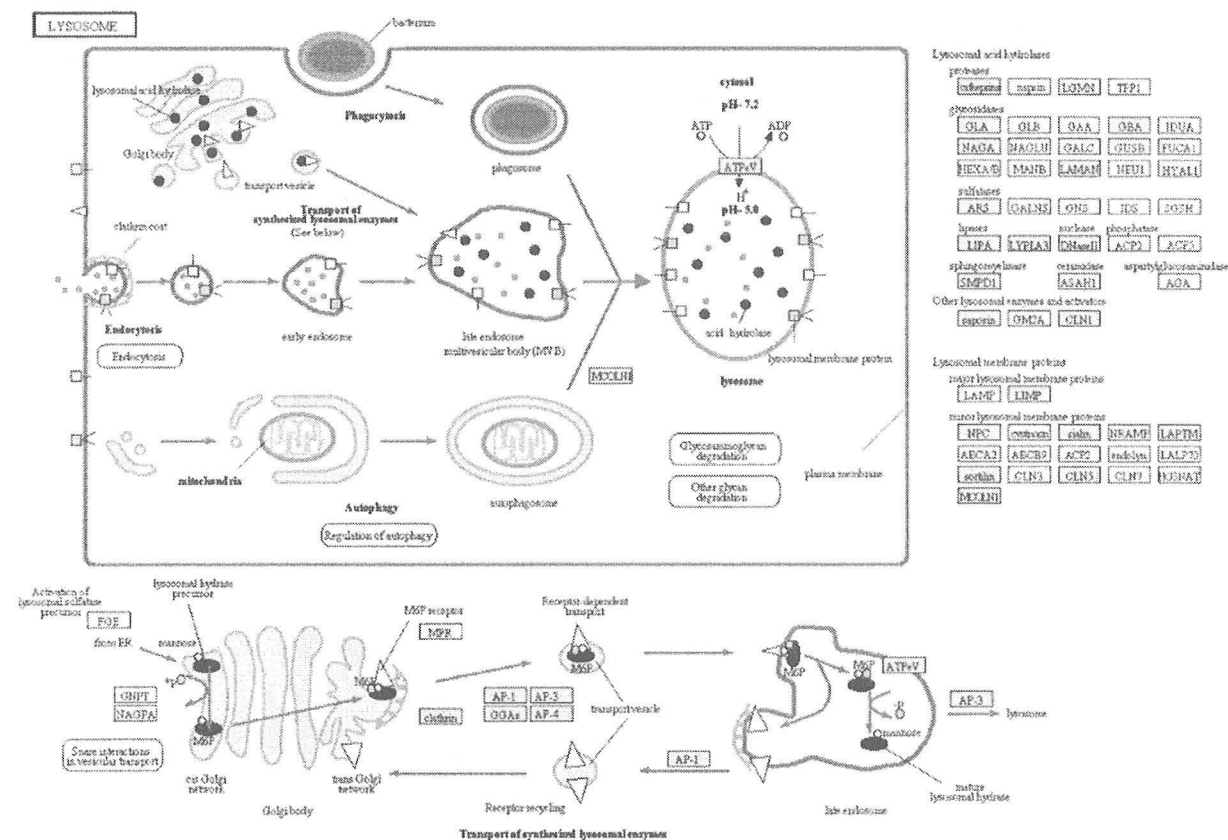


Fig. 5. Schematic comparison of *Mytilus* and KEGG reference lysosome mechanisms. Shaded boxes indicate proteins identified in our 454 results and white boxes the absent ones.

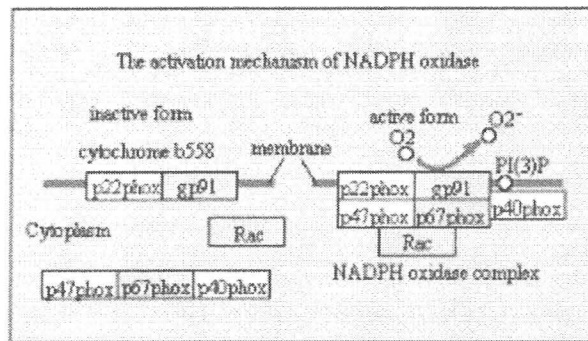


Fig. 6. Schematic comparison of *Mytilus* and KEGG reference activation mechanism of NADPH oxidase. Shaded boxes indicate proteins identified in our 454 results and white boxes the absent ones.

all elements which allow the degradation of bacteria: an acidic environment that impedes microbial growth, reactive oxygen and nitrogen species toxic for bacteria, antimicrobial peptides and proteins such as defensins and some endopeptidases and exopeptidases, hydrolases and proteases [72].

In the cDNA library, 39 KO were associated with the lysosome (Fig. 5). Among the lysosomal acid hydrolase, some transcripts showed high similarity with cathepsins, some glycosidases (GLA, GBA, NAGA and LAMAN), sulfatases (ARS) and lipases (LIPA, LYPLA3) (Fig. 5), which enables bacteria to be degraded.

AMPs and lysozymes can destroy bacteria by destabilizing their membrane permeability [33]. They are stored in granules as active forms and, after stimulation, they are involved in the destruction of bacteria inside phagocytes, before being released by exocytosis into hemolymph to participate in systemic responses [41,71]. Recognition of an infection by the Toll and *Immune deficiency* (Imd) pathway leads to a signaling cascade that typically results in the activation of AMPs genes. The Imd pathway is activated mainly by Gram-negative bacteria, such as *Vibrio* species [34,35,67]. Imd receptors were not identified in the cDNA library, but lysozyme (7 sequences related) and AMPs active against Gram-negative bacteria such as defensin, mytilin B, C and D (respectively 2, 6, 1 and 2 transcripts related) were highlighted. They probably activated by the Toll pathways. Also, 34 sequences with homology with myticin were found (32 for myticin C and 2 for myticin B). In *M. galloprovincialis*, myticin C was found to have a high polymorphic variability as well as chemotactic and immunoregulatory roles [73,74].

Associated with the phagocytic activity, the NADPH oxidase as well as nitric oxide (NO) synthase are activated to produce toxic radicals [28–32]. Fig. 6 shows the activation mechanisms of NADPH oxidase of phagocytic cells with the corresponding molecule found in the *M. edulis* transcriptome compared to the KEGG reference pathway. The activation of the NADPH oxidase enzyme proceeds through a multistep assembly at the plasma membrane of several components including the membrane-bound (p22^{phox} and gp91^{phox}) and cytoplasmic subunits (p40^{phox}, p47^{phox}, and p67^{phox}) and the small GTP-binding proteins (Rac) (Heyworth et al., 1993). In mussel hemocytes, transcripts having similarities with Rac, gp91^{phox} and p67^{phox} were present (Fig. 6).

In addition, our investigation led to the identification of a transcript homologous to putative cyclooxygenase. ROS can also be generated in the cytosol by other enzymes, including cyclooxygenase. Cyclooxygenase is involved in the first step of arachidonic acid oxidation leading to the production of prostaglandins, which are readily induced during inflammatory reactions in many tissues of the mussel [75]. This enzyme is also involved in the signaling pathways leading to hemocyte bactericidal activity [76].

To protect themselves from damage caused by toxic radicals, organisms use antioxidants, such as superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase and glutathione S-transferases to eliminate these free radicals by converting them to less toxic compounds [77]. Some of these antioxidant enzymes, the superoxide dismutase (7 sequences related) and the glutathione peroxidase (2 sequences related) were identified after BlastX.

In addition, 2 transcripts homologous to ferritin were present in the cDNA library. Ferritin is an iron chelating protein which has been classified as a stress protein due to its similarity with proteins involved in detoxification processes triggered by various stresses [78]. It is a critical component of iron homeostasis in various organisms. Iron is involved in respiratory burst activity by catalyzing the fenton reaction, which leads to the production of reactive oxygen species [79]. Hence, ferritin can regulate iron concentration to destroy microbial agents and at the same time protect cells from oxidative stress [80].

Furthermore, many endogenous substances are eliminated after being oxidized and conjugated to an anionic group (glutathione, glucuronate or sulfate) and then transported across the plasma membrane to the extracellular space. The latter step is mediated by integral membrane glycoprotein belonging to the superfamily of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters. A subfamily includes the multidrug resistance-associated proteins (MRPs) [81]. MRPs are of vital importance in detoxification and cellular homeostasis [82]. MRPs have been identified in mussels [83,84] as well as in our cDNA library (1 sequence related).

3.5.3. Other important molecules and pathways

Heat shock proteins (HSPs) are rapidly synthesized in response to stress. They are essential for several important processes such as protein folding, protection of proteins from denaturation or aggregation, and facilitation of protein transport through membrane channels. Besides molecular chaperones, HSPs also have a number of significant functions in the innate immune response [85] and they are well studied in bivalves [40,86–90]. For *M. edulis* hemocyte transcriptome, 39 transcripts with homologies with different HSPs were found (HSP70, HSP90, HSP40, HSP60).

Apoptosis plays a key role in immune system homeostasis and function, both in vertebrates and invertebrates [91,92]. A key characteristic of the majority of apoptotic pathways is the involvement of a family of proteases called caspases that cleave target proteins at specific sites typically containing aspartic acid residues followed by a caspase-specific three amino acid sequence [93]. Fig. 7 shows the apoptosis pathways with the corresponding molecule found in the *M. edulis* transcriptome compared to the KEGG reference pathway. 20 KO were associated with these pathways. Phillip et al. [26] found various transcripts for apoptosis related genes in the *M. edulis* transcriptome: a high number of TNF receptor like transcripts were identified, as well as various members of the Bcl-2 family and the apoptosis-inducing factor family (AIFs) and caspase-like transcripts. Also, caspases were characterized in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and caspase-specific responses were observed to pathogens [94]. Authors suggest that the apoptotic process in *Mytilus* species has a similar complexity to that of vertebrates [26,94]. In the present analysis, some transcripts had similarities with caspases (CASP8, CASP3, CASP7 and CASP6) and other components such as the Fas-associated death domain (FADD) (Fig. 7).

4. Conclusion

In the present work, a cDNA library was constructed and sequenced, which probably covers the major part of the transcriptome of the *M. edulis* hemocytes challenged with *V. splendidus* LGP32 strain. A total of 19,622 sequences were assembled and annotated. As revealed by homologies at nucleic and protein levels and with KEGG

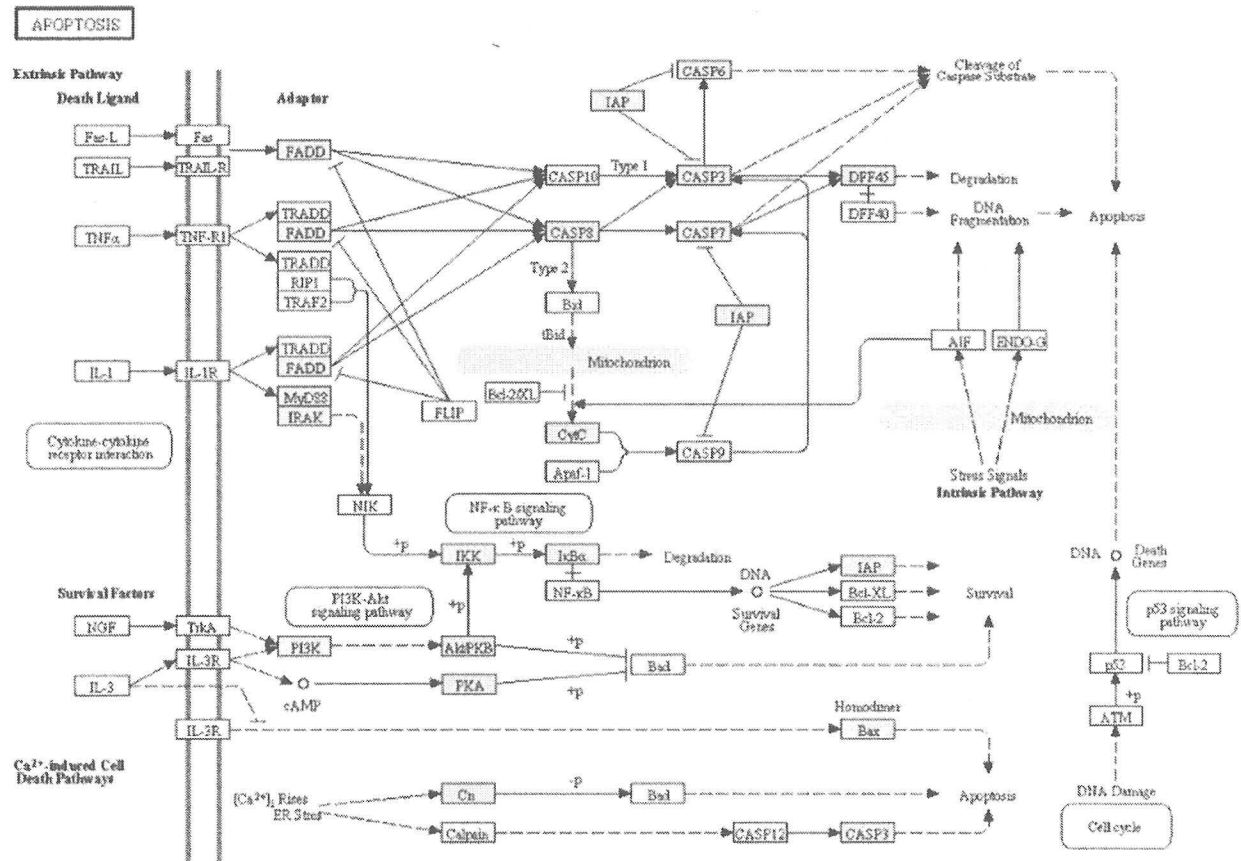


Fig. 7. Schematic comparison of *Mytilus* and KEGG reference apoptosis pathways. Shaded boxes indicate proteins identified in our 454 results and white boxes the absent ones.

annotations, some of the annotated sequences encoded to stress responses proteins, immune recognition receptors, immune effectors, Toll-receptor transduction pathway. Further studies will be focused on the quantification of gene expression levels of hemocytes at different exposure times. In this context, the sequences reported in this study could be used as a reference transcriptome for further high-throughput analysis such as RNA sequencing or microarrays.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Frédérique Le Roux (IFREMER) for providing the bacterial strain LGP32. This program and the doctoral fellowship of Marion Tanguy were supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Institute of Marine Science (University of Quebec at Rimouski), PEI Innovation and the Canadian Fund for Innovation.

References

- [1] Helm MM, Bourne N, Lovatelli A. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 2004;471. 177p.
- [2] Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Baron J, Moraga D, et al. A multi-parametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006;63:393–405.
- [3] Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research* 2000;19:353–9.
- [4] Gestal C, Roch F, Renault T, Pallavicini A, Paillard C, Novoa B, et al. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Reviews in Fisheries Science* 2008;16(51):131–54.
- [5] Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 2004;343:211–20.
- [6] Cai J, Li J, Thompson KD, Li C, Han H. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor* supertexta. *Journal of Basic Microbiology* 2007;47:84–6.
- [7] Gay M, Renault T, Pons AM, Le Roux F. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 2004;62:65–74.
- [8] Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B, Figueras A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71:98–104.
- [9] Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cuffe A, Gélébart F, Cordevant C, et al. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 2001;46:139–45.
- [10] Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cuffe A, Poulet SA. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001;67:2304–9.
- [11] Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 2002;15:251–8.
- [12] Gay M, Berthe F, Le Roux F. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2004;59:49–56.
- [13] Duperthuy M, Schmitt P, Garzón E, Caro A, Rosa RD, Le Roux F, et al. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:2993–8.
- [14] Binesse J, Delsert C, Saulnier D, Champomier-Vergès MC, Zagorec M, Munier-Lehmann H, et al. Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74:7108–17.

- [15] Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsp* by use of a novel counter-selectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology* 2007;73:777–84.
- [16] Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Romestand B, Caro A, Got P, et al. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* 2010;12951–63.
- [17] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002;20:197–216.
- [18] Venier P, De Pittà C, Bernante F, Laura Varotto L, De Nardi B, Bovo G, et al. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* 2009;10:72.
- [19] Jing X, Pales Espinosa E, Perrigault M, Allam B. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish and Shellfish Immunology* 2011;30:851–8.
- [20] Venier P, Varotto L, Rosani U, Millino C, Celegato B, Bernante F, et al. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 2011;12:69.
- [21] Yang J, Wang L, Zhang H, Qiu L, Wang H, Song L. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. *PLoS One* 2011;6:e17089.
- [22] Mateo DR, Greenwood SJ, Araya MT, Berthe FCJ, Johnson GR, Siah A. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by in vivo infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Developmental and Comparative Immunology* 2010;34:710–14.
- [23] Moreira R, Balseiro P, Planas JV, Fuste B, Beltran S, Novoa B, et al. Transcriptomics of *In Vitro* Immune-Stimulated Hemocytes from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Using High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35009.
- [24] Qiu L, Song L, Xu W, Ni D, Yu Y. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;22:451–66.
- [25] Zhang L, Li L, Zhang G. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology* 2011;30:653–60.
- [26] Philipp EER, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, et al. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33091.
- [27] Wang PH, Liang JP, ZH GU, Wan DH, Weng SP, Yu XQ, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology* 2012;36(2):359–71.
- [28] Arumugam M, Romestand B, Torreilles J, Roch P. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal of Cell Biology* 2000;79:13–19.
- [29] Buggé DM, Hégarret H, Wikfors GH, Allam B. Oxidative burst in hard clam (*Mercuraria mercenaria*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;23:188–96.
- [30] Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, et al. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish and Shellfish Immunology* 2009;26:515–23.
- [31] Gourdon I, Guérin MC, Torreilles J, Roch P. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 2001;5:1–6.
- [32] Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JL. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004;36:390–4.
- [33] Hancock R, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters* 2002;206:143–9.
- [34] Lemaître B, Hoffman J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 2007;25:697–743.
- [35] Wang L, Song L, Zhao J, Qiu L, Zhang H, Xu W. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): discovery and annotation of host-defense genes. *Fish and Shellfish Immunology* 2009;26:744–50.
- [36] Mita G, Vandenbulcke F, Roch P. Mini-review: original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 2000;486:185–90.
- [37] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. Innate immunity: isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:21808–13.
- [38] Tincu J, Taylor S. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:3645–54.
- [39] Araya MT, Markham F, Mateo DR, McKenna P, Johnson GR, Berthe FC, et al. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish and Shellfish Immunology* 2010;29:557–64.
- [40] Cellura C, Toubiana M, Parrinello N, Roch P. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;22(4):340–50.
- [41] Li H, Parisi M-G, Toubiana M, Cammarata M, Roch P. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish and Shellfish Immunology* 2008;25:143–52.
- [42] Mateo DR, Siah A, Araya MT, Berthe FCJ, Johnson GR, Greenwood SJ. Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology* 2009;102:50–6.
- [43] Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger JM, Siah A. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria. *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology* 2013;39:419–29.
- [44] Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Gueguen Y, et al. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 2009;10:341.
- [45] Bettencourt R, Pinheiro M, Egas C, Gomes P, Afonso M, Shank T, et al. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* 2010;11:559.
- [46] Clark MS, Thorne MA, Vieira FA, Cardoso JC, Power DM, Peck LS. Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 2010;11:362.
- [47] Craft JA, Gilbert JA, Temperton B, Dempsey KE, Ashford K, Tiwari B, et al. Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-Specific Expression Patterns. *PLoS ONE* 2010;5:e8875.
- [48] Huan P, Wang H, Baozhong L. Transcriptomic analysis of the Clam *Meretrix meretrix* on different larval stages. *Marine Biotechnology* 2012;14:69–78.
- [49] Brown M, Davies IM, Moffat CF, Craft JA. Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in *Mytilus edulis* in response to exposure to benzo[a]pyrene. *Marine Environmental Research* 2006;62:S128–135.
- [50] Tanguy A, Bierre N, Saavedra C, Pina B, Bachelère E, Kube M, et al. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 2008;408:27–36.
- [51] Venier P, Pallavicini A, De Nardi B, Lanfranchi G. Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 2003;314:29–40.
- [52] Ramsay A, Davidson J, Bourque D, Stryhn H. Recruitment patterns and population development of the invasive ascidian *Ciona intestinalis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquatic Invasions* 2009;4:169–76.
- [53] Bard JBL, Rhee SY. Ontologies in biology: design, applications and future challenges. *Nature Reviews Genetics* 2004;5:213–22.
- [54] Canesi L, Gavioli M, Pruzzo C, Gallo G. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 2002;57:469–76.
- [55] Cheng TC. A classification of molluscan haemocytes based on functional evidence. In: Bulla LA, Cheng TC, editors. *Comparative Pathobiology*. New York: Plenum Press; 1984, vol. 6, pp. 111–46.
- [56] Romero A, Dios S, Poisa-Beiro L, Costa MM, Posada D, Figueras A, et al. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 2011;35:334–44.
- [57] Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine* 2002;12(6):335–52.
- [58] Zhang H, Wang L, Song L, Song X, Wang B, Mu C, et al. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor. *Fish and Shellfish Immunology* 2009;26:56–64.
- [59] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–20.
- [60] Dziarski R. Review: mammalian peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in innate immunity. *Innate Immunity* 2010;16:168–74.
- [61] Itoh N, Takahashi KG. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2008;150:409–17.
- [62] Ni D, Song L, Wu L, Chang Y, Yu Y, Qiu L, et al. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Developmental and Comparative Immunology* 2007;31:548–58.
- [63] Su J, Ni D, Song L, Zhao J, Qiu L. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein (CfPGRP1) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;23:646–56.
- [64] Wei X, Yang J, Yang D, Xu J, Liu X, Yang J, et al. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. *Fish and Shellfish Immunology* 2012;32:178–85.
- [65] Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 2004;40:845–59.
- [66] Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 2000;49:159–70.
- [67] Wang PH, Gu ZH, Huang XD, Liu BD, Deng XX, Ai HS, et al. An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. *Molecular Immunology* 2009;46(8–9):1897–904.
- [68] Zhang H, Song L, Li C, Zhao J, Wang H, Qiu L, et al. A novel C1q-domain containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity. *Fish and Shellfish Immunology* 2008;25:281–9.
- [69] Gerdol M, Manfrin C, De Moro G, Figueras A, Novoa B, Venier P, et al. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules. *Developmental and Comparative Immunology* 2011;35:635–43.

- [70] Gestal C, Pallavicini A, Venier P, Novoa B, Figueras A. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental and Comparative Immunology* 2010;34:926–34.
- [71] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Roch P. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science* 1999;112:4233–42.
- [72] Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology* 2009;7(5):355–66.
- [73] Balseiro P, Falcó A, Romero A, Dios S, Martínez-López A, Figueras A, et al. *Mytilus galloprovincialis* Myticin C: A Chemotactic Molecule with Antiviral Activity and Immunoregulatory Properties. *PLoS ONE*. 2011;6:e23140.
- [74] Costa MM, Dios S, Alonso-Gutierrez J, Romero A, Novoa B, Figueras A. Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Developmental and Comparative Immunology* 2009;33:162–70.
- [75] Bouchard B, Gagné F, Fortier M, Fournier M. An *in-situ* study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 2009;150:132–40.
- [76] Canesi L, Scarpato A, Betti M, Ciacci C, Pruzzo C, Gallo G. Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research* 2002;54:547–51.
- [77] Yu Z, He X, Fu D, Zhang Y. Two superoxide dismutase (SOD) with different sub-cellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 2011;31:533–9.
- [78] Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003;303:139–45.
- [79] McCord JM. Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutrition Reviews* 1996;54:85–8.
- [80] Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996;1275:161–203.
- [81] Homolya L, Varadi A, Sarkadi B. Multidrug resistance associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 2003;17:103–14.
- [82] Sharma R, Awasthi YC, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S. Energy dependent transport of xenobiotics and its relevance to multidrug resistance. *Current Cancer Drug Targets* 2003;3:89–107.
- [83] Luedeking L, Van Noorden CJF, Koehler A. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 2005;286:167–75.
- [84] Nzoughe J, Hamilton JTG, Botting CH, Douglas A, Devine L, Nelson J, et al. Proteomics identification of azaspiracid toxin biomarkers in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Molecular and Cellular Proteomics* 2009;8:1811–22.
- [85] Wallin RPA, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in Immunology* 2002;23(3):130–5.
- [86] Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell* 2003;8:76–85.
- [87] Cellura C, Toubiana M, Parrinello N, Roch P. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Developmental and Comparative Immunology* 2006;30:984–97.
- [88] Franzellitti S, Fabri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;336:1157–63.
- [89] Piano A, Valbonesi P, Fabri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress and Chaperones* 2004;9:134–42.
- [90] Song L, Wu L, Ni D, Chang Y, Xu W, Xing K. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819), responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish and Shellfish Immunology* 2006;21:335–45.
- [91] Kiss T. Apoptosis and its functional significance in mollusks. *Apoptosis*. 2010;15:313–21.
- [92] Sokolova IM. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal* 2009;6:49–58.
- [93] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunology Review* 2003;193:10–21.
- [94] Romero A, Estévez-Calvar N, Dios S, Figueras A, Novoa B. New Insights into the Apoptotic Process in Mollusks: Characterization of Caspase Genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE* 2011;6(2):e17003.

Chapitre III

Réponses fonctionnelles et moléculaires des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à trois souches de *Vibrio splendidus*.

Le second chapitre a permis de connaître le transcriptome hémocytaire de *Mytilus edulis* exposé à *Vibrio splendidus*. Ce présent chapitre vise à étudier la cinétique des réponses immunitaires morphologiques et fonctionnelles au cours de l'infection bactérienne. Il se présente sous la forme d'une publication intitulée « *Functional and molecular responses in Mytilus edulis hemocytes exposed to bacteria, Vibrio splendidus* ».

Afin de répondre à ce second objectif, un modèle *in vitro* d'interactions hémocytes-bactéries a été développé en exposant les hémocytes de *M. edulis* à 3 souches de *V. splendidus*, la souche virulente LGP32, la souche LGP32 Δvsm dont le gène codant pour la métalloprotéinase a été délété et une souche environnementale 7SHRW endémique à l'Ile du Prince Edouard. Les modifications phénotypiques (non-adhérence des cellules) et fonctionnelles (capacité de phagocytose et activation du stress oxydant) ont été suivies par microscopie et cytométrie en flux. Au niveau moléculaire, à partir de la banque d'ADNc, 12 transcrits pertinents ont été sélectionnés et leurs niveaux ont été mesurés grâce à une analyse en multiplex. Ces approches technologiques ont permis de relier les changements d'expression aux modifications phénotypiques que subissent séquentiellement les hémocytes. Nous pensons que cette étude apportera un modèle utile pour les études des stades précoces des processus d'interactions hôtes (les hémocytes de *M. edulis*) - pathogènes (*Vibrio splendidus*).

Publication 2: Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*.

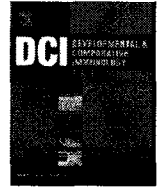
Publiée dans « *Developmental & Comparative Immunology* »

Résumé

Cette étude a pour but d'étudier les réponses morphologiques, fonctionnelles et moléculaires des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à différentes souches de bactéries Gram-négative *Vibrio splendidus* (une souche virulente *V. splendidus* LGP32, *V. splendidus* LGP32 Δ vsm sans métalloprotéinase et une souche environnementale *V. splendidus* 7SHRW) à un ratio de 1:3 pendant 2, 4 et 6 heures. Nos données ont montré que les hémocytes pourraient avoir une capacité discriminatoire envers les microorganismes. Les deux souches de *V. splendidus* LGP32 ont un effet significatif sur l'adhésion des hémocytes, les capacités de phagocytose et le stress oxydant, alors que la souche environnementale 7SHRW a un effet peu marqué et retardé au cours de l'exposition. Au niveau moléculaire, les niveaux différentiels des transcrits candidats ont été mesurés pour les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 et 7SHRW. Principalement, nous avons observé une sous-régulation de la défensine chez les hémocytes exposés à *V. splendidus* LGP32. Aussi, une sur-régulation à 2 heures suivi par une sous-régulation à 4 et 6 heures d'exposition à la souche LGP32 ont été observé pour les transcrits homologue au lysozyme et au protéasome 26S. De la même façon, les gènes codant pour la SOD et GPx sont sur-régulés à 2 heures post-exposition à la souche LGP32 et leurs expressions sont diminuées après 4 et 6 heures d'exposition. D'autres études sont nécessaires afin de relier les variations des niveaux de transcrits avec les processus physiologiques.

Mots clés

Mytilus edulis, hémocytes, *Vibrio splendidus*, réponses hôtes, expression de gène.



Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*

Marion Tanguy^{a,b,c}, Patty McKenna^c, Sophie Gauthier-Clerc^b, Jocelyne Pellerin^b, Jean-Michel Danger^{a,*}, Ahmed Siah^{c,d,*}

^a Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon, BP540, 76058 Le Havre, France

^b Institute of Marine Science, University of Quebec at Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

^c Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College (AVC), University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, PE, Canada C1A 4P3

^d British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, 871A Island Highway, Campbell River, BC, Canada V9W 2C2

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2012

Revised 5 October 2012

Accepted 5 October 2012

Available online 7 December 2012

Keywords:

Mytilus edulis

Hemocytes

Vibrio splendidus

Host response

Gene expression

ABSTRACT

This study aims at examining the morphological, functional and molecular responses of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to different strains of Gram-negative bacteria *Vibrio splendidus* (a virulent strain *V. splendidus* LGP32, *V. splendidus* LGP32 Δ vim without metalloprotease and an environmental type strain *V. splendidus* 7SHRW) at a 1:3 ratio for 2, 4, and 6 h. Our data showed that hemocytes could have a discriminative capacity towards microorganisms. Both *V. splendidus* LGP32 strains had an effect on hemocyte adhesion, phagocytosis abilities and oxidative burst, whereas the environmental strain 7SHRW induced weak and delayed hemocyte responses. At a molecular level, differential levels of candidate transcripts were measured in *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP and 7SHRW. Mainly, a down-regulation of defensin was recorded in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32. A significant up-regulation of lysozyme and proteasome 26S was observed at 2 h followed by a down-regulation at 4 and 6 h of exposure to the LGP32 strain. Similarly, SOD and GPx genes were up-regulated 2 h post-exposure to LGP32 strain and their expressions decreased after 4 and 6 h post-exposure. Further analysis is however needed in a near future to relate the transcript level variations with the physiological process.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mussels of the genus *Mytilus*, which are tolerant to a wide range of environmental changes, are intensively studied bivalves due to their economic importance, their role in biomonitoring programs as a sentinel species in many areas of the world and their use in the prevention of the spread of invertebrate diseases and human pathogens (Auffret et al., 2006; Bettancourt et al., 2009; FAO, 2008). Understanding how their biological systems respond to microbiological challenges is also an opportunity to investigate and elucidate the basic physiological principles that rule the defense mechanisms in mollusks (Bettancourt et al., 2009).

The defenses of bivalve mollusks against pathogens rely on the innate immune system. Hemocytes play a major role in these host defenses as mediators of cellular and, indirectly, of humoral de-

fenses. Circulating hemocytes are mostly found in the hemolymph and extrapallial fluid (Allam and Paillard, 1998).

The innate system, through hemocytes, is able to recognize unique and characteristic molecules present at the surface of microorganisms, such as lipopolysaccharides (Gram negative bacteria) or peptidoglycans (Gram positive bacteria), known as pathogen-associated molecular patterns (PAMP) (Costa et al., 2009). The host cell recognizes the PAMP through lectins, and membrane-bound receptors, like Toll-like receptors, which are referred to as pathogen recognition receptors (PRR) (Janeway and Medzhitov, 2002). For an efficient defense mechanism, both cellular and humoral processes are involved in a coordinated way. Following interaction with bacteria, hemocytes are responsible for cell-mediated defense reactions such as phagocytosis and activation of a variety of cytotoxic reactions such as the release of lysosomal enzymes and antimicrobial peptides (AMPs) (Li et al., 2008; Mitta et al., 1999). A recent study suggests that antibacterial activities of *Crassostrea gigas* hemocytes involve phenoloxidases and specifically laccase catalyzed reactions (Luna-Acosta et al., 2011). Associated with the phagocytic activity, the generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) also plays an important defense role against pathogens, thus enabling the oxidation of these foreign invaders (Arumugam et al., 2000; Buggé et al., 2007; Costa et al.,

* Corresponding authors. Address: British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, BC CAHS, 871A Island Highway, Campbell River, BC, Canada V9W 2C2 (A. Siah). Tel.: +33 (0) 2 32 74 43 02; fax: +33 (0) 2 32 74 43 14 (J.-M. Danger), tel.: +1 250 286 6102; fax: +1 250 286 6103 (A. Siah).

E-mail addresses: jean-michel.danger@univ-lehavre.fr (J.-M. Danger), ahmed.siah@cahs-bc.ca (A. Siah).

2009; Gourdon et al., 2001; Novas et al., 2004). Oxidative burst represents these two main pathways (Dröge, 2002).

Among the bacteria, members of the Gram-negative genus *Vibrio* are the most frequently isolated bacteria from mollusks. Several species belonging to this genus have been related to mortalities and diseases in larvae and juvenile individuals (Cai et al., 2007; Gay et al., 2004a; Gómez-León et al., 2005; Lacoste et al., 2001a,b; Le Roux et al., 2002). In particular, *Vibrio splendidus* is considered as a widespread bivalve pathogen. For example, the strain LGP32 has been associated to massive mortality events in the production of *C. gigas* oysters in France (Gay et al., 2004b). Recent studies have explored the route of infection and pathogenic processes of this strain (De Decker and Saulnier, 2011; Duperthuy et al., 2011).

Different responses of the host are attributed to *V. splendidus* challenge. Hemocytes spontaneously develop cytoplasmic extensions (pseudopods) and rapidly adhere when they are placed on a flat surface (Labreuche et al., 2006b). However, when hemocytes are associated with pathogenic bacteria or their extracellular products, they lose their pseudopodia and become rounded (Labreuche et al., 2006b; Lane and Birkbeck, 1999). Consequently, their adhesion and phagocytic capabilities are reduced (Labreuche et al., 2006a). In fact, the virulence factor of the bacterial strain has been associated with the disruption of cytoskeleton filament stability of mollusk cells, which would lead to the loss of pseudopodia as well as a reduced adhesion and phagocytosis ability (Labreuche et al., 2006b; Lane and Birkbeck, 1999). Indeed, Araya et al. (2009) have shown that hemocytes of the clam *Mya arenaria* rapidly lose their pseudopodia when in contact with *V. splendidus* LGP32 strain, become rounded in shape and display a reduced phagocytic activity as measured by their ability to engulf latex beads. Moreover, *in vivo* infection of *M. arenaria* by the same strain causes changes in cell structure, cell number, adherence (Mateo et al., 2009a) and lysosome content (Mateo et al., 2009b) of hemocytes, whereas low or no significant changes are observed with *V. splendidus* 7SHRW strain. Also, studies conducted in hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* have compared the pathogenic effects and the host differential responses at a cellular level (i.e. total cell counts, lysozyme activity and lysosome stability) of *V. splendidus* LGP32 to other *Vibrio* strains (Ciacci et al., 2009; Li et al., 2008; Parisi et al., 2008).

At a molecular level, a recent study showed that exposure to virulent *Vibrio* (*V. splendidus* LGP32-GFP and *Vibrio aestuarianus* 02/041) induces a significant down-regulation of immune-related genes in *C. gigas* hemocytes occurring during the first 6 h of challenge (De Decker and Saulnier, 2011). Moreover, differential gene expression analysis associated with studies on immune responses (i.e. antimicrobial peptides, lysozyme genes) have been performed in *M. galloprovincialis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 (Cellura et al., 2007; Li et al., 2008; Venier et al., 2011). Araya et al. (2010) used a Suppression Subtractive Hybridization (SSH) strategy to identify differentially expressed immune transcripts in *M. arenaria* hemocytes exposed *in vitro* to *V. splendidus* LGP32. Ficolin, killer cell lectin-like receptor, natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp-1*), mitogen-activated protein kinases (MAPK), ferritin, heat shock proteins 90 (HSP90) and cathepsin showed similar expression patterns: an up-regulation at 1 h, followed by a down-regulation at 2 and 3 h. Moreover, an *in vivo* exposure to *V. splendidus* LGP32 induced a down-regulation of Toll-like receptor 2 (TLR-2) and an up-regulation of interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in hemocytes of *M. arenaria*, while no significant regulation was observed with *V. splendidus* 7SHRW (Mateo et al., 2010).

In the present work, an *in vitro* model of hemocytes–bacteria interaction was developed using hemocytes exposed to 3 strains of the Gram-negative bacteria *V. splendidus* (a virulent strain

V. splendidus LGP32, *V. splendidus* LGP32 Δvsm without metalloproteinase and *V. splendidus* 7SHRW). This study aims at understanding the short-term kinetics of morphological (cell adhesion), functional (phagocytic activity and oxidative burst activation) and molecular (differential expression in immune related genes) immune responses in *Mytilus edulis* hemocytes challenged with *V. splendidus*. The expression level of the targeted genes was quantified using the multiplex DNA branched technology. This technology enables a high-throughput analysis by quantifying multiple mRNA targets from the same and unique sample (Lee et al., 2009). Multiplex gene expression quantification is widely used in transcript profiling in human cancer diagnostic (Ching et al., 2011) and has recently been successfully performed in soft-shell clams *M. arenaria* hemocytes (Siah et al., 2012).

2. Materials and methods

2.1. Mussels and hemolymph collection

Adult mussels, *M. edulis*, 3–5 cm in shell length, were collected from Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada). Mussels were kept and maintained in a 300 L tank with re-circulating artificial seawater (Instant Ocean®) at a temperature of 16–17 °C and a salinity of 30 ppt. Animals were fed with Spat Formula (Innovative Aquaculture Products Ltd.) every day.

Hemolymph (1–5 ml from each individual) was withdrawn from the adductor muscle of blue mussels using 3 ml syringes fitted with 25 gauge needles and quality of hemolymph was checked for each individual using an inverted microscope (ZEISS, Germany). Then, hemolymph was filtered through an 80 μ m mesh to eliminate particles such as aggregated hemocytes, gametes and other debris. In each assay, hemolymph was pooled into a sterilized 30 ml tube and cell concentration in hemolymph was determined using a hemocytometer; this concentration was used to determine the number of bacteria to be added in the hemocytes infection assay.

2.2. Bacterial strains and growth conditions

The virulent strain *V. splendidus* LGP32-GFP was isolated from an episode of 'summer mortalities' syndrome in juvenile oysters *C. gigas* in France (Gay et al., 2004a,b). This strain has also been reported to be pathogenic to several bivalve species, such as *Ruditapes philippinarum* and *M. arenaria* clams and *M. galloprovincialis* and *M. edulis* mussels (Araya et al., 2009; Ciacci et al., 2009; Le Roux et al., 2002; Li et al., 2010; Mateo et al., 2009a,b; Parisi et al., 2008; Venier et al., 2011).

The derivative strain *V. splendidus* LGP32 Δvsm differs from LGP32 in that the *vsm* gene encoding for a secreted metalloproteinase has been deleted (Le Roux et al., 2007). This metalloproteinase has been identified as a determining factor for toxicity of *V. splendidus* LGP32 extracellular products (Binesse et al., 2008).

V. splendidus 7SHRW is an environmental and non-pathogenic type strain isolated from marine sediments of Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada) (Mateo et al., 2009a). Our previous studies showed that 7SHRW had a slight modulation effect on the functional and molecular immune functions of *M. arenaria* hemocytes in comparison to LGP32 strain (Mateo et al., 2009a, 2010).

The three strains were cultured overnight to reach exponential growth phase in Trypticase Soy Broth (TSB, BD-Bacto™) supplemented with 2% NaCl at 16 °C in 250 ml Erlenmeyer flasks, shaken at 100 rpm. The bacterial concentration was determined by optical density measured with a spectrophotometer (UNICO spectrophotometer; Montreal Biotech, Inc) at 540 nm according to 1

$OD_{540nm} = 3.15 \times 10^8$ bacteria *V. splendidus* LGP32-GFP, 1 $OD_{540nm} = 2.84 \times 10^8$ bacteria *V. splendidus* LGP32 Δvsm and 1 $OD_{540nm} = 1.67 \times 10^8$ bacteria *V. splendidus* 7SHRW as estimated by flow-cytometry cell counting. For flow cytometry analysis, bacteria were collected by centrifugation (5000g, 4 °C, 10 min), washed twice with filtered (0.22 μ m) sterile seawater (FSSW), and adjusted to approximately 3.6×10^6 bacteria/ml in FSSW. The three-*Vibrio* strains had the same growth characteristics (data not shown).

2.3. In vitro exposure of *M. edulis* hemocytes to *V. splendidus*

2.3.1. Cell culture medium

One million hemocytes were added to each well of 24-well plates previously filled with 1 mL of L-15 growth media (Leibovitz L-15 medium (Sigma, ON, Canada)). In order to adjust the osmolarity to mussel hemolymph (~990 mOsm/l), the L-15 was slightly modified by the addition of 20.2 g/l NaCl, 0.54 g/l KCl, 0.6 g/l $CaCl_2$, 1 g/l $MgSO_4$, 83 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10% of glucose and 10% of heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS). The cell culture was incubated for 1 h at 16 °C to enable hemocytes to adhere to the bottom of the wells.

2.3.2. Exposure experiment

Bacteria were added to hemocyte cultures at a 1:3 hemocyte:bacteria ratio. Controls represent hemocytes incubated in L-15 media without bacteria. Hemocytes were exposed to bacteria for 2, 4 and 6 h. For each exposure time (0, 2, 4 and 6 h), 6 biological replicates were performed and cell viability was assessed using the Trypan blue exclusion method.

2.4. Cells morphology: non-adherent hemocytes

To ensure that the hemocytes would maintain their ability to adhere, no anti-adhesion solution was used in this study. The *in vitro* exposure of *M. edulis* hemocytes to *V. splendidus* was performed in 24-well-plates in L-15 medium. For control (0 h) and after 2, 4 and 6 h of bacteria exposure, the growth media was removed and centrifuged (500g; 15 min; 4 °C), there were 6 replicates per exposure time. Pellets containing non-adherent hemocytes were resuspended in FSSW and cells were counted on a hemocytometer with a phase contrast microscope (Axio Imager; ZEISS, Germany) at 400 \times magnification. Cell viability of non-adherent cells was assayed by the Trypan blue exclusion technique.

2.5. Flow cytometry analysis

The pooled samples from each experimental treatment were divided into different 5 ml flow cytometer tubes (Falcon; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to undergo the following analyses with a BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

The Leibovitz L-15 medium cannot be used for these experiments because the phenol red pH indicator interferes with fluorescence. Consequently, exposures were done in FSSW.

2.5.1. Phagocytosis assay

The phagocytosis assay used was adapted from Allam and Ford (2006) and Araya et al. (2009). For each strain of *V. splendidus*, three experimental conditions (groups) were performed. In the exposed group, a 170 μ l subsample of hemolymph was mixed with 340 μ l of *V. splendidus* (LGP32-GFP; LGP32 Δvsm ; or 7SHRW) to generate a 1:3 hemocyte:bacteria ratio. In the control group, 170 μ l of hemolymph was mixed with 340 μ l of FSSW. Cytochalasin B (Sigma) was added to another 170 μ l subsample of hemolymph at

the final concentration of 10 μ g/ml. For each challenge, three pools of hemolymph from 4 to 5 mussels were used and each experimental condition had 18 replicates (6 replicates per pool). Tubes were incubated for 0, 2, 4 or 6 h at 16 °C. After exposure, fluorescent beads (phycoerythrin labeled (red) beads; Ø 2 μ m; Polysciences Inc., Warrington, PA) were added to hemocytes to generate a 40:1 bead to hemocyte ratio and tubes were incubated in the dark for an additional 2 h on gentle shaking. The internalization of the beads was stopped by placing test tubes on ice. Then, flow cytometry was used to measure red fluorescence (FL-2). Peaks of fluorescence corresponded to the numbers of beads associated with the hemocytes. We estimated the percentage of hemocytes internalizing 2 or more beads according to Araya et al. (2009). Bead attachment to cells, unrelated to phagocytosis was estimated by flow cytometry following a cytochalasin B pretreatment of hemocytes (10 μ g/ml for 0–6 h) as described elsewhere (Araya et al., 2009). The fluorescence value in presence of cytochalasin B was deducted from all other measurements.

2.5.2. Oxidative burst assay

The oxidative burst assay was adapted from Hégaret et al. (2003) and Araya et al. (2009). For each challenge, four experimental groups were selected. For the exposed group, a 170 μ l subsample of hemolymph was mixed with 340 μ l of *V. splendidus* (LGP32-GFP; LGP32 Δvsm ; or 7SHRW) suspension at a 1:3 hemocyte:bacteria ratio. In the control group, 170 μ l of hemolymph was mixed with 340 μ l of FSSW. Phorbol 1,2-myristate 1,3-acetate (PMA; 10 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) was added to another 170 μ l subsample of hemolymph. Another group of hemocytes was exposed to *V. splendidus* and PMA simultaneously. PMA was used as a positive control for its ability to induce oxidative burst (Costa et al., 2009). For each challenge, three pools of hemolymph from 4 to 5 mussels were used and each experimental condition had 18 replicates (6 replicates per pool). Tubes were incubated for 0, 2, 4 or 6 h at 16 °C. After exposure, nonfluorescent 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 10 μ M; Sigma) was added to samples. DCFH-DA diffuses into the cells and is oxidized by hydrogen peroxide or nitric oxide to DCF, which emits a green fluorescence. Then, tubes were incubated in the dark for an additional hour and green fluorescence was measured using flow cytometry (FL-1). Hemocyte oxidative burst was calculated as the geometric mean of fluorescence for each sample and the activation was evaluated by the formula: $Gm_{Exposed}/Gm_{FSSW}$ where $Gm_{Exposed}$ is the geometric mean of fluorescence of hemocytes exposed to bacteria, PMA, or PMA and Bacteria and Gm_{FSSW} is the geometric mean of fluorescence of hemocytes with FSSW (Control). However, *V. splendidus* LGP32-GFP is tagged with GFP, which could contribute to the fluorescence measured in *V. splendidus* LGP32-GFP-treated groups of hemocytes. Hence, the respiratory burst activity of *V. splendidus* LGP32-GFP-treated groups of hemocytes was measured as a difference in fluorescence between *Vibrio*-exposed hemocytes treated with DCFH-DA and *Vibrio*-exposed hemocytes without DCFH-DA.

2.6. Microsphere-based multiplex branched DNA assay

2.6.1. Cell lysate preparation

Cell lysate preparations were conducted following the Affymetrix (US) protocol. At each exposure time, the growth media was carefully removed from wells and 500 μ l of L-15 modified medium and 500 μ l of working lysis mixture (500 μ l Lysis Mixture with 150 μ g of Proteinase K) were mixed.

The content was thoroughly vortexed and the plate was incubated at 50 °C for 30 min to lyse the cells and release target total RNA from the hemocytes. This step was repeated 3 times. Cell lysates were stored at –80 °C until use.

2.6.2. Design of probe sets

The assay uses 3 probe sets, namely Capture Extenders (CEs), Label Extenders (LEs), and Blockers (BLs), which are all capable of specifically hybridizing the RNA targets. Different fluorescent beads are coated with CEs, thus enabling hybridization and discrimination among the different RNA targets. LEs probe sets are designed to hybridize the branched DNA thus allowing the signal amplification. Each branched DNA contains multiple hybridization sites for biotinylated Label Probes that bind Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin (SAPE). The combined fluorescence signals resulting from both the capture beads and SAPE are read on a Luminex 100 flow cytometer (Luminex Corp., Austin, CA, US).

The design of probe sets was carried out by the manufacturer (Affymetrix Inc., CA, US) from the sequences of 12 transcripts encoding proteins related to immunity or stress which had been identified in a cDNA library (Table 1). Elongation factor 1 was used as a housekeeping gene which was shown to be among the most stable genes in *M. arenaria* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 (Araya et al., 2008).

2.6.3. Target RNA capture

Specific transcripts were captured to their respective beads through a Capture Extender/Capture Probe interaction during an overnight hybridization at 54 °C. Briefly, a working bead mixture was prepared by combining 5.2 µl nuclease-free water, 6.6 µl lysis buffer, 2 µl blocking reagent, 0.2 µl proteinase K, 1 µl capture beads and 5 µl of probe sets per well in a 96-well-plate. A total volume of 20 µl of working bead mix was dispensed into each well of the hybridization plate, and 80 µl of diluted cell lysate was added. The plate was then sealed and placed into a shaking incubator at 54 °C overnight.

2.6.4. Signal amplification and detection

To develop the amplified signal, the alkaline phosphatase substrate dioxetane (QuantiGene® 2.0 system, Affymetrix, Inc., CA, USA) was added to the wells and incubated at 50 °C for 1 h. The signal was detected using a Luminex 100 flow cytometer (Luminex Corp., Austin, CA, US). Nuclease-free water was used for background quantification instead of total RNA. The average medium fluorescence was subtracted from the background and normalized to the housekeeping gene.

2.7. Statistical analysis

Hemocytes' adhesion, their ability to engulf beads, oxidative burst production and relative transcripts levels data were analyzed

using one-way analysis of variance (ANOVA; SigmaStat 2.03) to determine the significance between the different experimental conditions in each assay. Student's *t*-test (SigmaStat 2.03) was used to compare exposed groups with the control group at each sampling time. Results are expressed as the mean ± standard deviation, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

During each experiment performed in this work, the cells viability was assessed using Trypan Blue. More than 90% of the hemocytes were viable before performing the assays.

3.1. Capacity of the bacterial strains to impair hemocyte adhesion

As shown in Fig. 1, both strains LGP32-GFP and LGP32 Δvsm induced a significant and progressive increase of non-adherent hemocytes at 2, 4 and 6 h of exposure compared to the control. At 6 h, more than 10% of hemocytes exposed to these strains were non-adherent. For the environmental strain (7SHRW), only a significant but slight increase of non-adherent hemocytes was observed after 6 h of exposure. In addition, microscopic observations revealed that the non-adherent hemocytes were rounded in shape (data not shown).

3.2. Effects of the bacterial strains on hemocytes' ability to engulf beads

The effect of *Vibrio* strains on hemocytes' ability to engulf beads was investigated by providing fluorescent beads to hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP, LGP32 Δvsm or 7SHRW (Fig. 2). In control groups (without bacteria), the percentage of hemocytes internalizing 2 and more beads was about 20–28%. Then, *V. splendidus* LGP32-GFP and LGP32 Δvsm induced a significant and progressive decrease of hemocytes' ability to engulf beads after 2, 4 and 6 h of exposure. With *V. splendidus* 7SHRW, a significant decrease was observed following 6 h of exposure.

3.3. *Vibrio* strains capacities to induce oxidative burst

When hemocytes were treated with Phorbol 1,2-myristate 1,3-acetate (PMA), a chemical used as a positive control, the results showed a significant activation of oxidative burst compared with the other treatment groups (data not shown). Thus, *M. edulis* hemocytes were able to produce toxic radicals ensuring that

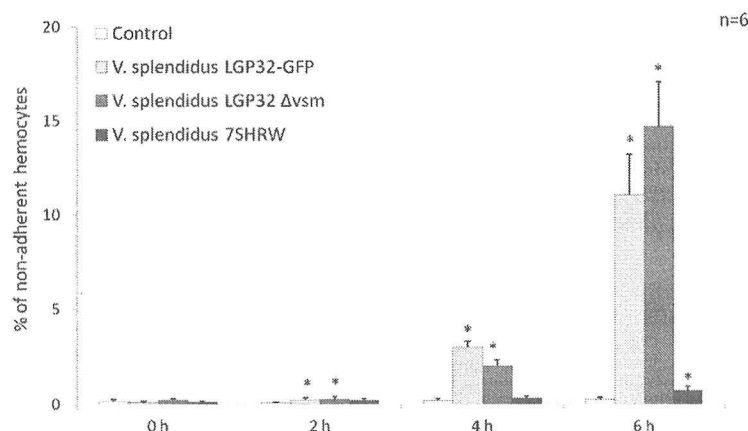


Fig. 1. Non-adherent hemocytes (% of the total number of hemocytes) after incubation for 2, 4 and 6 h with the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain, the derivative LGP32 Δvsm strain and with *V. splendidus* 7SHRW (mean ± standard deviation). The control (incubation in L-15 media without bacteria) was performed at 0 h and for each exposure time. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control and infected (*t*-test), $n = 6$.

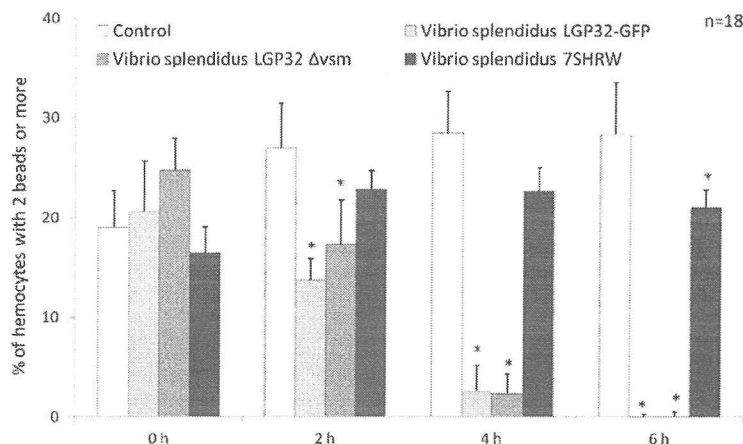


Fig. 2. Effects on hemocytes' ability to engulf beads after incubation for 2, 4 and 6 h with the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain, the derivative LGP32 Δvsm strain or with *V. splendidus* 7SHRW (mean \pm standard deviation). The control (incubation in sea water) was performed at 0 h and for each exposure time. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control and infected (t -test), $n = 18$.

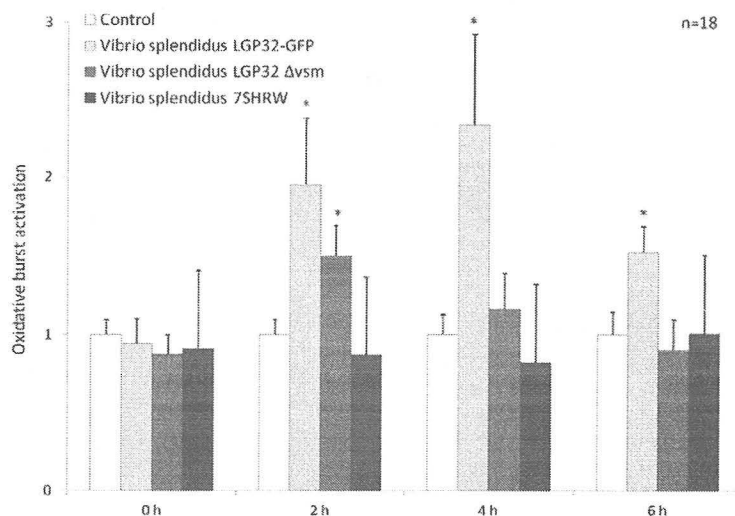


Fig. 3. Oxidative burst activation after incubation for 2, 4 and 6 h with the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain, the derivative LGP32 Δvsm strain or with *V. splendidus* 7SHRW (mean \pm standard deviation). The control (incubation in sea water) was performed at 0 h and for each exposure time. Activation is expressed as the ratio of geometric mean fluorescences of exposed hemocytes to control hemocytes (see Section 2 for details). Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control and infected (t -test), $n = 18$.

oxidative burst was induced by bacterial infection. Compared to control, a significant activation of oxidative burst was observed in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP for 2, 4 and 6 h, and in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 Δvsm for 2 h (Fig. 3). For hemocytes exposed to *V. splendidus* 7SHRW, no significant effect was detected.

3.4. Short-term kinetics of "candidate" transcript levels in hemocytes during vibrio exposure

Differential levels of 12 target transcripts selected as "candidates" in hemocyte responses to *V. splendidus* LGP32 strain and 7SHRW strain at 2, 4 and 6 h were quantified, normalized and compared with the mean expression in control samples (0 h). These transcripts were chosen as they encode antimicrobial peptides, antioxidants enzymes, degradation enzymes or regulatory proteins.

3.4.1. Transcripts encoding for antioxidants enzymes and antimicrobial peptides (AMPs)

Compared to control (hemocytes incubated without bacteria), both transcripts encoding for antioxidants enzymes tested had

differential levels in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP (Fig. 4a(A)). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNAs were significantly ($p < 0.05$) up-regulated after 2 h and significantly ($p < 0.01$) down-regulated after 4 h of exposure.

Also, the normalized transcript levels revealed that the transcript related to defensin was differentially expressed. Defensin mRNA was significantly ($p < 0.001$) down-regulated after 4 and 6 h of hemocyte exposure to *V. splendidus* LGP32-GFP. For mytilin B transcripts, a high standard deviation was observed, which likely reflects a strong variability between samples (Fig. 4b(A)).

When hemocytes were exposed to the environmental strain *V. splendidus* 7SHRW, no significant variation of transcript levels was observed (Fig. 4a(B) and 4b(B)).

3.4.2. Transcripts encoding for enzymes of protein catabolism and for proteins involved in defense mechanisms

In comparison to control hemocytes incubated without bacteria, both transcripts related to degradation activities were differentially expressed in hemocytes exposed to both strain *V. splendidus* LGP32-GFP and 7SHRW. mRNAs encoding for lysozyme and a proteasome 26S subunit were significantly ($p < 0.05$) up-regulated

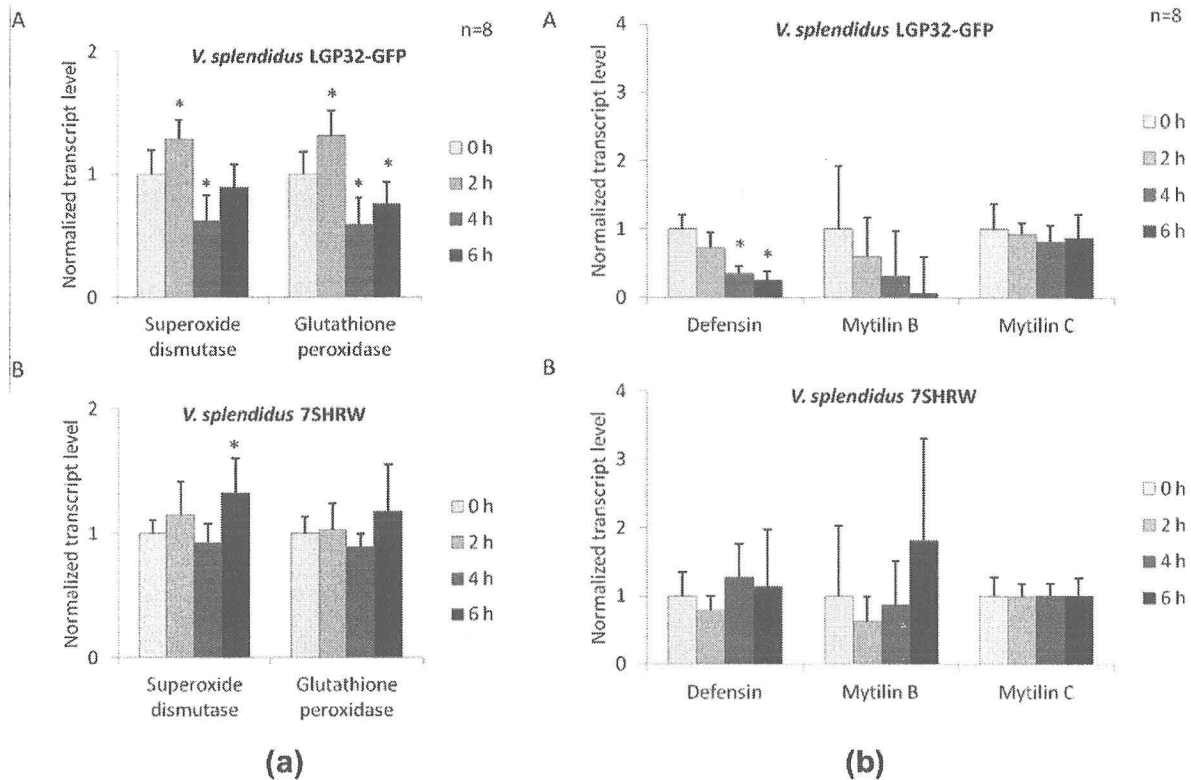


Fig. 4. Normalized transcript levels of: a- transcripts encoding for two antioxidant enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and b- three antimicrobial peptides (defensin, mytilin B and mytilin C) in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain (A) and the 7SHRW strain (B) (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified using the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 8$.

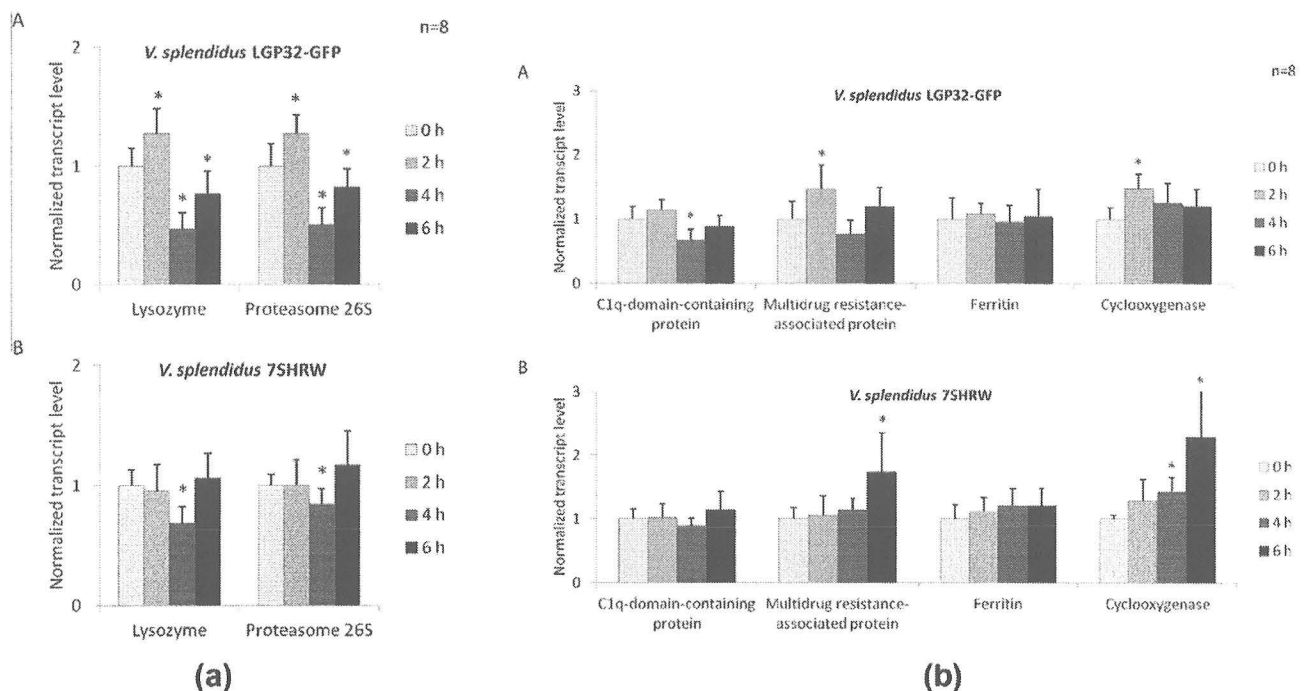


Fig. 5. Normalized transcript levels of: a- transcripts encoding for lysozyme and proteasome 26S and b- transcripts encoding for C1q-domain-containing protein, multidrug resistance-associated protein, ferritin and cyclooxygenase in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain (A) and the 7SHRW strain (B) (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified by the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 8$.

after 2 h of exposure to the virulent strain and significantly ($p < 0.05$) down-regulated after 4 and 6 h of exposure to the strain LGP32-GFP and after 4 h of exposure to the strain 7SHRW (Fig. 5a).

Moreover, some transcripts encoding proteins related to regulatory activities were differentially expressed in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP. Multidrug resistance-associated protein (MRP) and Cyclooxygenase (COX) were significantly ($p < 0.05$) up-regulated after 2 h of exposure and C1q-domain containing protein (C1qDC) were significantly ($p < 0.05$) down-regulated after 4 h of exposure. In hemocytes exposed to *V. splendidus* 7SHRW, the high standard deviation of normalized transcripts levels that was observed likely reflected a strong variability between samples. However, MRP and COX were significantly ($p < 0.05$) up-regulated after 6 h of exposure (Fig. 5b).

4. Discussion

Although numerous studies in various mollusk species at the cellular and/or molecular level have been conducted with the aim of better understanding the immune response (Araya et al., 2009, 2010; Choquet et al., 2003; Ciacci et al., 2009, 2010; Costa et al., 2009; De Decker and Saulnier, 2011; de Lorgeril et al., 2011; Labreuche et al., 2006a,b; Lambert et al., 2003; Li et al., 2008; Luna-Acosta et al., 2011; Mateo et al., 2009a, 2010; Parisi et al., 2008), basic physiological principles that rule defense mechanisms still remain largely unknown. Among bivalve species, mortality events in mussels caused by infective agents and parasites appear less frequently than in other species such as oysters (Costa et al., 2009; Venier et al., 2011). This would indicate that mussels possess a relatively more efficient immune system, which is able to successfully defend itself against foreign microorganisms. Also, because the strains related to *V. splendidus* are widely distributed in various environments and display an elevated genetic diversity, they may be associated with a wide range of host susceptibility (Gay et al., 2004a).

Do mussel hemocytes have a discriminative capacity towards microorganisms as already suggested by Bachère et al. (2004)? The existence of specific interactions between hemocytes and different *Vibrio* strains has already been supported by various studies in which a variety of phenotypic responses have been assessed *in vitro* (i.e. viability, cells adherence, oxidative burst) (Araya et al., 2009; Choquet et al., 2003; Costa et al., 2009; Lambert et al., 2003; Nottage and Birkbeck, 1990) and *in vivo* (i.e. mortality, kinetics of bacterial clearance, hemocytes structure, numbers and adherence, lysosomal membrane destabilization) (Ciacci et al., 2010; Gay et al., 2004a; Mateo et al., 2009a; Parisi et al., 2008). This study has assessed morphological (cell adhesion), functional (phagocytic ability and oxidative burst activation) and molecular (differential transcripts levels) responses of hemocytes of the blue mussel *M. edulis* exposed *in vitro* to 3 strains of *V. splendidus* for 2, 4 and 6 h.

4.1. Hemocyte response to the *Vibrio* strains: modifications of adherence, phagocytosis and induced oxidative burst

Data presented in this paper showed that modifications in hemocyte adherence, phagocytic ability and oxidative burst activation occurred in response to the three different strains of *V. splendidus*. However, the kinetics of cell responses varied with the strain tested. Compared to control (unchallenged), significant changes in numbers of non-adherent hemocytes, in phagocytic ability and in oxidative burst activation were observed at 2 h following exposure to *V. splendidus* strains LGP32 and LGP32 Δ vs m , whereas it only appeared following 6 h of exposure to *V. splendidus* 7SHRW.

A number of studies conducted in bivalve species have indicated that *Vibrio* species, known to be pathogenic to bivalves, are able to disrupt the ability of hemocytes to adhere and provoke cell rounding. For example, such a phenomenon has been previously documented during *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum* infection in *M. edulis* (Lane and Birkbeck, 1999, 2000) or during *V. splendidus* LGP32 *in vitro* or *in vivo* challenge in *M. arenaria* (Araya et al., 2009; Mateo et al., 2009a). In hemocytes of *R. philippinarum* and *C. gigas*, a significant decrease of adhesive capabilities caused by several strains of *Vibrio tapetis* and by *V. aestuarianus* 01/32 ECPs has also been documented (Choquet et al., 2003; Labreuche et al., 2006a). Considering that 7SHRW is an endemic bacterium isolated from sediment in the Prince Edward Island area where the mussels were collected and since the LGP32 strain was originally isolated from oysters collected from France, was postulated that the mussel hemocytes could respond differently depending on *V. splendidus* isolates (Araya et al., 2009; Mateo et al., 2009a,b).

The specific mechanism of bacteria-induced cell rounding, as well as impairment of adhesive capabilities, has been associated with the presence of surface components on the bacterium or by excreted toxins (Lane and Birkbeck, 1999). Moreover, it has been demonstrated that *V. splendidus* LGP32 strain possesses metalloprotease considered as being the main toxic factor affecting bivalve mollusks (Binesse et al., 2008). However the same response patterns were obtained with LGP32-GFP or with LGP32 Δ vs m strains, thus suggesting that metalloprotease deletion mutant could not display impaired virulence capabilities of LGP32. As a matter of fact, recent studies have explored the route of infection and pathogenic processes of the *V. splendidus* LGP32 strain and the outer membrane protein (OMP) OmpU has recently been demonstrated to play a key role in LGP32 virulence (Duperthuy et al., 2010, 2011). OmpU-recognition was shown to subvert the host cell actin cytoskeleton resulting in actin and clathrin polymerization. *V. splendidus* LGP32 strains could use a similar process to invade *M. edulis* hemocytes and disrupt the cytoskeleton, thus increasing the number of non-adherent hemocytes. Since the 7SHRW strain had virtually no effect on adhesion capabilities and on cell morphology, it would be of interest to determine the OmpU status of this particular *Vibrio* strain.

Adhesion constitutes an initial step in phagocytosis of foreign particles. Data obtained on the ability of hemocytes treated *in vitro* with the 3 strains of *V. splendidus* to engulf fluorescent latex beads correlated well with hemocytes' adhesion results. A similar reduction of phagocytosis has already been observed in previous studies with *V. aestuarianus* 01/32 ECPs injection and with *in vitro* exposure to *V. splendidus* LGP32 (Araya et al., 2009; Labreuche et al., 2006a).

In the cascade of events taking place during the host immune response, the oxidative burst, i.e. the production of cytotoxic ROS and NO is a general protective mechanism in most animal species and constitutes a critical step during which potential pathogens and parasites are eliminated following phagocytosis. Results showed a significant activation of oxidative burst in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 for 2, 4 and 6 h. These data could appear contradictory with studies showing that bacteria seem to have developed a strategy to escape from hemocyte killing by preventing *in vitro* ROS production in hemocytes of soft-shell clams *M. arenaria* exposed to *V. splendidus* (Araya et al., 2009). This may suggest that blue mussels are less sensitive to the cytotoxic products secreted by LGP32 than other bivalves and are therefore considered to be particularly resistant to *Vibrio* infection (Ciacci et al., 2010).

ROS production was attenuated in hemocytes exposed to 7SHRW strain in comparison to LGP32 and LGP32 Δ vs m strains. Previous studies reported data on the ability of *Vibrio* species or

their extra-cellular products to exert cellular responses through the generation of oxidative burst (Buggé et al., 2007; Costa et al., 2009; Labreuche et al., 2006a,b). For instance, Labreuche et al. (2006a) have shown that ROS production may promote cytotoxicity in hemocytes, allowing *Vibrio* cells to overcome cellular defenses, thereby facilitating bacterial growth and dissemination in the host. Further research needs to be undertaken to elucidate this hypothesis.

4.2. Transcript level variations during infection by *Vibrio* strains

To link functional responses with molecular immune responses, differential levels of candidate transcripts were measured in *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP and 7SHRW.

The initial step of the immune responses is the detection and recognition of foreign invaders by hemocytes. Several molecules, such as lectins or Toll-like receptors, are known to be involved in pathogen recognition. In mollusks and many other invertebrates lacking adaptive immunity, C1q-domain-containing (C1qDC) proteins, which have been identified as lectin members, are involved in a specialized class of pattern recognition molecules (Gerdol et al., 2011). In the present study, we observed a decrease of C1qDC mRNA levels at 4 h of exposure to *V. splendidus* LGP32. However, no changes were recorded with the 7SHRW strain. These observations appear to be contradictory with previous studies conducted in *M. galloprovincialis* hemocytes that showed that both Gram⁺ (*Micrococcus lysodeikticus*) and Gram[−] (*V. anguillarum*) bacteria lead to an increase in C1qDC transcript levels (Gerdol et al., 2011; Gestal et al., 2010). Results presented in this study may reflect pathogenicity molecular process of LGP32 strain to avoid immune defense of hemocytes.

Cyclooxygenase (COX) is involved in the first step of arachidonic acid oxidation leading to the production of prostaglandins, which are readily induced during inflammatory reactions in many tissues of the mussel (Bouchard et al., 2009) and hemocyte bactericidal activity (Canesi et al., 2002). The COX transcript levels recorded in hemocytes would suggest that cyclooxygenase is involved in the early stages of hemocyte–*Vibrio* interaction.

In parallel to the phagocytic and oxidative burst activity, the antimicrobial peptides (AMPs) are involved in the immune defense. These humoral molecules known as cysteine-rich peptides can destroy bacteria by destabilizing their membrane permeability (Hancock and Rozek, 2002). Synthesized even in the absence of challenge, they are stored in granules as active forms and are then involved in the destruction of bacteria inside phagocytes, before being released by exocytosis into the hemolymph to participate in systemic responses (Mitta et al., 2000). *V. splendidus* LGP32 appeared to decrease the expression level for defensin gene after 4 and 6 h of exposure. In previous studies on *M. arenaria*'s hemocytes exposed *in vitro* to *V. splendidus* LGP32, an up-regulation of the genes related to immune responses has been recorded in the first hour of exposure followed by a significant down-regulation after 2 and 3 h of exposure (Araya et al., 2010), which is in accordance with our findings. In addition, a down-regulation of several AMPs was measured in mussels injected with *V. splendidus* LGP32 (Venier et al., 2011). As mentioned by Duperthuy et al. (2011), *Vibrio* LGP32 may exert its pathogenic effects when located in host cells. One of these effects could well be to diminish host cell capacities of defense by lowering down host cells' transcript levels encoding AMPs. The lack of effect of the 7SHRW strain on both morphological and functional responses is consistent with this hypothesis and with the absence of response to this non-pathogenic strain in soft-shell clams' hemocytes (Mateo et al., 2010).

Similarly to AMPs, lysozymes constitute an important component of innate immune defenses against diverse microbial infections. They are stored in granules and can be released into

hemolymph by exocytosis. Increases in plasma lysozyme activity in response to various bacteria or bacterial components have been observed in different bivalve species (Allam et al., 2006; Ciacchi et al., 2009; Pruzzo et al., 2005). Thus, the transient up-regulation at 2 h of exposure to LGP32 strain could represent an early response against bacteria aiming at lysozyme production. Therefore, the down-regulation could be explained, like the defensin down-regulation, by the toxicity of the intracellular LGP32 strain. Moreover, the regulatory cellular mechanism could adjust the proteolytic enzyme levels to the actual needs. Lysozyme mRNA levels in hemocytes exposed to the 7SHRW strain was down-regulated at 4 h of exposure followed by a return to basal levels at 6 h. Similarly, Mateo et al. (2010) found a down-regulation of lysozyme mRNA levels in hemocytes of soft-shell clams exposed to the 7SHRW strain. The molecular mechanism by which the 7SHRW strain affects the lysozyme transcript levels in *M. arenaria*'s and *M. edulis* hemocytes remains therefore unexplained.

The proteasome 26S is a proteolytic complex responsible for the degradation of a vast majority of proteins (Voges et al., 1999; Zwickl et al., 1999). Regulated proteolysis by the proteasome is thought to influence cell cycle progression, transcriptional control, and other critical cellular processes (Nabhan et al., 2007). Compared to control, we observed a significant up-regulation of proteasome 26S transcript levels at 2 h of exposure to the LGP32 strain, as if hemocytes were preparing themselves to protein degradation or recycling. Therefore, the down-regulation at 4 and 6 h could reflect a proper adaptation of proteasome number in the cells.

Excessive production of toxic radicals may have several negative effects such as lipid peroxidation, DNA damage, loss of cellular function, and ultimately apoptosis and necrosis (De Zoysa et al., 2011). To protect themselves from damage caused by toxic radicals, organisms use antioxidant activities, such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) to eliminate free radicals by converting them to less toxic compounds (Yu et al., 2011). As suggested by Labreuche et al. (2006b), the down-regulation observed, along with the increased rate of free radicals, may overwhelm the host cell defenses, leading to an oxidative stress that may be involved in the pathogenesis. Indeed, with the environmental *V. splendidus* 7SHRW strain, no significant differences in the SOD and GPx mRNA levels were observed.

The transport of many endogenous substances across the plasma membrane into the extracellular space is mediated by integral membrane glycoproteins belonging to the superfamily of ATP-Binding Cassette transporters. A subfamily includes the multidrug resistance-associated proteins (MRPs) (Homolya et al., 2003). MRPs are ubiquitously expressed in normal tissues and are active transporters of reduced glutathione, glucuronide and organic anions of toxicological relevance, either conjugated or unconjugated with sulfate providing a vital importance in cellular homeostasis and detoxification (Luedeking et al., 2005). Transcript levels encoding MRPs in hemocytes were up-regulated at 2 h of exposure to *V. splendidus* LGP32 and at 6 h of exposure to the 7SHRW strain. *V. splendidus* can modulate the MRPs expression with early responses with the pathogenic strain.

5. Conclusion

Morphological (non-adherent hemocytes), functional (phagocytic activity and oxidative burst activation) and molecular responses of *M. edulis* hemocytes were examined when exposed to different strains of Gram-negative bacteria *V. splendidus* at a ratio of 1:3 for 2, 4 and 6 h. More important and stronger responses were observed with the virulent LGP32 strain. Same patterns of responses were observed with both LGP32 strains for morphological and phagocytic activity. For the oxidative burst pathways, LGP32-

Δvsm strain induced a less important activation when compared to LGP32. This is in accordance with previous studies (Binesse et al., 2008; Le Roux et al., 2007) and indicates that, in *M. edulis*, the metalloprotease might be involved in pathogenesis, although LGP32 virulence in oysters has been chiefly attributed to OmpU (Duperthuy et al., 2010). The environmental 7SHRW strain induced weak and delayed hemocyte responses compared to the *V. splendidus* LGP32 strains. This strain would prove to be a valuable negative control of pathogenicity in *M. edulis* hemocytes. At the molecular level, differential levels of candidate transcripts were measured in *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32-GFP and 7SHRW. With the development of next-generation sequencing technologies, the analysis of transcriptome variation may lead to the identification of a series of key molecular actors of innate immunity in bivalve species. One way to explore the rational for the different pathogenicities of LGP32-GFP and 7SHRW *Vibrio* strains would be to compare their genome sequences and address the relevancies of mutations in candidate genes.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Frédérique Le Roux (IFR-EMER) for providing the bacterial strain LGP32-GFP*. This program and the doctoral fellowship of Marion Tanguy were supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Institute of Marine Science (University of Quebec at Rimouski), PEI Innovation and the Canadian Fund for Innovation.

References

- Allam, B., Ford, S., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 374–383.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 384–397.
- Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in extrapallial fluids of clams. *Dis. Aquat. Org.* 33, 123–128.
- Araya, M.T., Markham, F., Mateo, D.R., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C., Siah, A., 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 557–564.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of softshell clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* 28 (4), 751–758.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C., 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 326–331.
- Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P., 2000. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 513–519.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393–405.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 652–664.
- Bettancourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., Serrão Santos, R., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152, 278–289.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Le Roux, F., 2008. Metalloprotease *vsm* is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108–7117.
- Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., Fournier, M., 2009. An *in-situ* study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Eliptio complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 150, 132–140.
- Buggé, D.A., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188–196.
- Cai, J., Li, J., Thompson, K.D., Li, C., Han, H., 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *J. Basic Microbiol.* 47, 84–86.
- Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C., Gallo, G., 2002. Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar. Environ. Res.* 54, 547–551.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 340–350.
- Ching, L.K., Mompoin, F., Guderian, J.A., Picone, A., Orme, I.M., Coler, R.N., Reed, S.G., Baldwin, S.L., 2011. Transcriptional profiling of *HLI-4/7/8*-stimulated guinea pig splenocytes and whole blood by bDNA assay. *J. Immunol. Methods* 373 (1–2), 54–62.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* haemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 57, 109–116.
- Ciacci, C., Betti, M., Canonico, B., Citterio, B., Roch, P., Canesi, L., 2010. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 49–55.
- Ciacci, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P., Canesi, L., 2009. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp. Biochem. Physiol.* 153B, 365–371.
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 515–523.
- De Decker, S., Saulnier, D., 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 30 (2), 691–699.
- de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., Bachère, E., 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PLoS One* 6 (8), e23142. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023142>.
- De Zoysa, M., Whang, I., Nikapitiya, C., Oh, C., Cheol, Y.C., Lee, J., 2011. Transcriptional analysis of disk abalone (*Haliotis discus discus*) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 155–160.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédu-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinet, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2993–2998.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 12, 951–963.
- Food and agriculture organization, 2008. The state of World Fisheries and Aquaculture, SOFIA. Available in <[ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf](http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf)>.
- Gay, M., Berthe, F., Le Roux, F., 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 49–56.
- Gay, M., Berthe, F., Le Roux, F., 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* 62, 49–56.
- Gerdol, M., Manfrin, C., De Moro, G., Figueras, A., Novoa, B., Venier, P., Pallavicini, A., 2011. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 635–643.
- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., Figueras, A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 926–934.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B., Figueras, A., 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 98–104.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 5, 1–6.
- Hancock, R., Rozek, A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 143–149.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of hemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Hemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Homolya, L., Váradi, A., Sarkadi, B., 2003. Multidrug resistance-associated proteins: export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17 (1–4), 103–114.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006a. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 379–387.

- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Buolo, V., Huver, A., Nicolas, J.-L., 2006b. Cellular and molecular hemocyte response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715–2724.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cuff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001a. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* 46, 139–145.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cuff, A., Poulet, S.A., 2001b. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2304–2309.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225–240.
- Lane, E., Birkbeck, H., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23, 275–279.
- Lane, E., Birkbeck, H., 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Living Resour.* 12, 343–350.
- Lee, A., Chae, B., Song, B., Jung, S., Yim, H., 2009. QuantiGene 2.0 assay for ER, PR and HER2 RNA levels is a useful adjunctive for the evaluation of ER, PR and HER2 in breast cancer. *Cancer Res.* 69 (S4), 4153.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., Mazel, D., 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counter-selectable suicide vector. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 777–784.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15, 251–258.
- Li, H., Venier, P., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Toubiana, M., Quartesan, R., Borghesan, F., Novoa, B., Figueras, A., Roch, P., 2010. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. *Fish Shellfish Immunol.* 28 (4), 640–648.
- Li, H., Parisi, M.-G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 143–152.
- Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F., Koehler, A., 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 167–175.
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., De Decker, S., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 795–800.
- Mateo, D.R., Greenwood, S.J., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Siah, A., 2010. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 710–714.
- Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009a. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence. *J. Invert. Pathol.* 102, 50–56.
- Mateo, D.R., Spurmanis, A., Siah, A., Araya, M.T., Kulka, M., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009b. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker. *Dis. Aquat. Org.* 86, 253–262.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000. Minireview: original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112, 4233–4242.
- Nabhan, J.F., El-Shehaby, F., Patocka, N., Ribeiro, P., 2007. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. *Exp. Parasitol.* 117, 337–347.
- Nottage, A.S., Birkbeck, T.H., 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 56 (1), 15–19.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.L., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *J. Biochem. Cell Biol.* 36 (3), 390–394.
- Parisi, M.G., Li, H., Jouvet, L.B.P., Dyrnyda, E.A., Parinello, N., Cammarata, M., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 834–840.
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L., 2005. Minireview: persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ. Microbiol.* 7 (6), 761–772.
- Siah, A., McKenna, P., Danger, J.M., Johnson, G., Berthe, F.C.J., 2012. Expression of RAS-like family members, c-jun and c-myc mRNA levels in neoplastic hemocytes of soft-shell clams *Mya arenaria* using microsphere-based 8-plex branched DNA assay. *Results Immunol.* 2, 83–87.
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Clegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A., Pallavicini, A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12, 69.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068.
- Yu, Z., He, X., Fu, D., Zhang, Y., 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 533–539.
- Zwickl, P., Voges, D., Baumeister, W., 1999. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos. Trans R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 1501–1511.

Chapitre IV

Les acteurs moléculaires impliqués dans les réponses immunitaires des hémocytes de *Mytilus edulis* exposés à *Vibrio splendidus* LGP32

Le second chapitre a permis de connaître le transcriptome hémocytaire de *M. edulis* exposé à *V. splendidus* et d'obtenir un transcriptome de référence. Dans le troisième chapitre, un modèle *in vitro* d'interactions hémocytes-bactéries a été développé en exposant les hémocytes de *M. edulis* à *V. splendidus*. Dans ce modèle, la cinétique des réponses immunitaires morphologiques et fonctionnelles au cours de l'infection bactérienne a été étudiée et liée à des réponses moléculaires. Pour poursuivre, ce quatrième chapitre vise à identifier la cinétique des réponses moléculaires à grande échelle en quantifiant les niveaux de transcrits pendant l'infection bactérienne. La mesure d'expression différentielle des transcrits est déterminée grâce à l'application d'une nouvelle technologie de séquençage à haut débit : le *RNA-Seq* qui permet une analyse globale du transcriptome. Ainsi, cette technique a été conduite sur les hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne. Ce chapitre se présente sous la forme d'une publication intitulée « *The immune response of Mytilus edulis hemocytes exposed to Vibrio splendidus LGP32 strain: a transcriptomic attempt at identifying molecular actors* ».

Publication 3: The immune response of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain: a transcriptomic attempt at identifying molecular actors.

Résumé

Les moules marines *Mytilus edulis*, tolérantes à une large gamme de changements environnementaux, combinent un rôle clé comme espèce sentinelle pour des programmes de surveillance environnementale et une importance économique en raison de leur production en aquaculture dans plusieurs régions du monde. Les événements de mortalité causés par des agents infectieux et des parasites n'ont pas été décrits chez les moules, ce qui laisse penser qu'elles possèdent un système immunitaire efficace pour lutter contre les microorganismes. Pour obtenir une vue générale des mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses immunitaires précoces, un « *RNA-Seq* » du transcriptome des hémocytes de *M. edulis* non-exposés et exposés à *V. splendidus* LGP32 pendant 2, 4 et 6 heures a été réalisé.

Un total de 149 296 séquences assemblées et annotées a été obtenu et l'ensemble a été comparé avec les voies de référence KEGG. Plusieurs séquences en relations avec l'immunité ont été identifiées telles que des TLRs, des facteurs de transcription, des cytokines, des inhibiteurs de protéases et des protéines de stress ainsi que des séquences codant des protéines impliquées dans l'adhésion des cellules, la phagocytose, le stress oxydant, l'apoptose et l'autophagie.

Entre chaque temps d'exposition, les analyses d'expression différentielle révèlent plusieurs transcrits régulés. 10 groupes ont été créés selon les occurrences cinétiques des transcrits. Les séquences de chaque groupe ont été associées à des termes de « *Gene Ontology* » (GO) de la catégorie des processus biologiques. Parmi les transcrits régulés, on retrouve des transcrits ayant des homologues avec des galectines, des protéines apparentées aux fibrinogènes, des récepteurs Toll, MyD88, des peptides antimicrobiens, des hydrolases lysosomales, des protéines de chocs

thermiques et des inhibiteurs de protéases ainsi que des séquences en relation avec le stress oxydant et les processus apoptotiques.

Des niveaux différentiels de transcrits candidats ont été mesurés chez les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 et 7SHRW en utilisant une technologie d'ADN branché. Des sur-régulations des gènes codant pour l'inhibiteur kappa B, la protéine inhibitrice de l'apoptose, la protéine tumorale D54, la protéine kinase sérine/thréonine SIK2 ont été observées en réponse aux deux souches bactériennes.

Mots clés

Mytilus edulis, Hémocytes, *Vibrio splendidus*, Transcriptome, *RNA seq*, expression de gènes.

The immune response of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain: a transcriptomic attempt at identifying molecular actors.

Marion Tanguy^{1,2,3}, Patty McKenna³, Sophie Gauthier-Clerc², Jocelyne Pellerin², Jean-Michel Danger^{1*}, Ahmed Siah^{3,4*}

¹Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon, BP540, 76058 Le Havre, France

²Institute of Marine Science, University of Quebec at Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

³Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College (AVC), University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, PE, Canada C1A 4P3

⁴British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, 871A Island Highway, V9W 2C2, Campbell River, BC, Canada

*Correspondence should be addressed to:

Jean-Michel Danger, PhD

Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre,
25 rue Philippe Lebon, BP540, 76058 Le Havre, France

Email: jean-michel.danger@univ-lehavre.fr

Phone : +33 (0)2 32 74 43 02

Fax : +33 (0)2 32 74 43 14

Ahmed Siah, PhD

British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, BC CAHS

871A Island Highway,

Campbell River BC

V9W 2C2 Canada

Email: ahmed.siah@cahs-bc.ca

Phone : +1 250 286 6102

Fax : +1 250 286 6103

Abstract

The marine mussel *Mytilus edulis*, tolerant to a wide range of environmental changes, combines a key role as a sentinel species for environmental monitoring programs and a significant economic importance. Mortality events caused by infective agents and parasites have not been described in mussels, which suggests an efficient immune system. To obtain a general picture of the molecular mechanisms involved in the early immune responses, we performed “RNA-seq” of the *M. edulis* hemocytes transcriptome of unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain during 2, 4 and 6 hours.

A total of 149,296 assembled and annotated sequences has been obtained and compared to KEGG reference pathways. Several immune related sequences were identified such as TLRs, transcription factors, cytokines, protease inhibitors, stress proteins and sequences encoding for proteins involved in cell adhesion, phagocytosis, oxidative stress, apoptosis and autophagy.

Between each exposition time, differential expression analysis revealed several regulated transcripts. 10 clusters of transcripts were created according to kinetics of transcript occurrence. These sequences were assigned to biological process’ Gene Ontology (GO) category. Among these regulated transcripts were present sequences encoding for galectins, fibrinogen-related proteins, TLRs, MyD88, some antimicrobial peptides, lysosomal hydrolases, heat shock proteins and protease inhibitors, as well as proteins of oxidative stress and apoptosis.

Differential levels of candidate transcripts were measured in *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 and 7SHRW by using branched DNA technology. Transcripts encoding for inhibitor kappa B, inhibitor of apoptosis proteins, tumor protein D54, serine/threonine-protein kinase SIK2 were identified as up-regulated in hemocytes exposed to both strains.

Keywords: *Mytilus edulis*, Hemocytes, *Vibrio splendidus*, Transcriptome, RNA seq, Gene expression

1. Introduction

Bivalves, in particular mussels on the genus *Mytilus*, tolerant to a wide range of environmental changes, combine a key role as sentinel species for environmental monitoring programs and a significant economic importance because of the aquaculture production in many areas of the world (Auffret et al., 2006; Helm et al., 2004). During the past decades, reports of mortality events and diseases caused by bivalve's pathogens, in particular members of the Gram-negative bacteria genus *Vibrio*, have increased (Gestal et al., 2008; Cai et al., 2007; Gómez-León et al., 2005; Gay et al., 2004a,b; Huvet et al., 2004; Le Roux et al., 2002; Lacoste et al., 2001a, b; Cheney et al., 2000;). For example, *V. splendidus* LGP32 has been associated to massive mortality events in the production of *Crassostrea gigas* oysters in France (Gay et al., 2004a).

The circulating hemocytes and a variety of molecular effectors provide the only line of defense against potential pathogens, relied to innate immunity. Hemocytes are reported to be effective cells in immune responses of mollusks (Canesi et al., 2002). On one hand, hemocytes participate directly in pathogen elimination by phagocytes and encapsulation. On the other hand, they produce humoral components including lysosomal enzymes, aminopeptidases, lectins and antimicrobial molecules that contribute to destroy pathogens (Pruzzo et al., 2005).

The initial step of the innate system is the detection and recognition of foreign invaders. Unique and characteristic molecules present at the surface of microorganisms, such as lipopolysaccharides (Gram-negative bacteria) or peptidoglycans (Gram-positive bacteria), known as pathogen-associated molecular patterns (PAMP) can be recognized by hemocytes. The host cell recognizes the PAMP through lectins and membrane bound receptors, like toll-like receptors, which are referred as pathogen recognition receptors (PRR) (Janeway and Medzhitov, 2002). Different types of lectins (C-type lectin, sialic acid binding lectin, fucoselectin, galectin) have been characterized in *Mytilus galloprovincialis* (Venier et al., 2009). The diversity of C-type lectin sequences may answer to the variety of pathogens. Therefore, C-type lectins are considered as PRR by some authors (Jing et al., 2011; Venier et al., 2011; Yang et al., 2011). Also, many C1q-domain-containing (C1qDC) proteins can be regarded as specialized class of pattern recognition proteins through the expanding interaction properties of the trimeric globular domain gC1q

(Gerdol et al., 2011; Venier et al., 2011). In addition, toll-like receptors (TLR-2 homolog and CgToll-1) have been identified in hemocytes of *Mya arenaria* and *C. gigas*, respectively (Zhang et al., 2011; Mateo et al., 2010) and the concept that TLRs recognize specific molecular patterns in various pathogens has been established (Yamamoto et al., 2004). Different molecules are involved in the TLR pathway: MyD88 is a Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor modulating TLR pathway by interacting with IL-1 receptor associated kinase (IRAK). IRAK associates with TRAF6 and then activates NF- κ B pathway (Yamamoto et al., 2004; Akira et al., 2001).

Once activated by interaction between PAMPs and PRR, hemocytes display chemotactic and chemokinetic reactions and carry out cell-mediated defense reactions such as phagocytosis and activation of a variety of cytotoxic reactions like release of lysozomal enzymes and antimicrobial peptides (AMPs) (Li et al., 2008; Mitta et al., 1999). For example, TLR pathway regulates chemokine and antimicrobial release in the hemolymph (Zhang et al., 2011). AMPs, known as cysteine-rich peptides, can destroy bacteria by destabilizing their membrane permeability (Hancock and Rozek, 2002). In mussels, four groups of AMPs (defensins, mytilins, myticins and mytimycins) have been identified and characterized (Mitta et al., 2000). These AMPs have specific and complementary antimicrobial activities. Defensins and myticins are more active against Gram-positive bacteria than against the Gram-negative. Mytimicins are exclusively anti-fungal (Charlet et al., 1996). Mytilins act both on Gram-negative and Gram-positive bacteria, including vibrios (Tincu and Taylor, 2004; Mitta et al., 2000).

Associated with the phagocytic activity, the NADPH oxidase as well as nitric oxide (NO) synthase are activated leading then to the production of reactive oxygen species (ROS) and NO enabling the oxidation of the foreign invaders (Costa et al., 2009a; Buggé et al., 2007; Novas et al., 2004; Gourdon et al., 2001; Arumugam et al., 2000). Excessive production of toxic radicals may lead to several negative effects such as lipid peroxidation, DNA damage, loss of cellular function, and ultimately apoptosis and necrosis (De Soiza et al., 2011). To protect themselves from damage caused by toxic radicals, organisms use antioxidants, such as superoxide dismutases

(SOD) and glutathione peroxidase (GPx) to eliminate these free radicals by converting them to less toxic compounds (Yu et al., 2011).

Several studies have recently been interested to the molecular mechanisms of hemocytes challenged with different *Vibrio*, notably *V. splendidus* LGP32 strain (Tanguy et al., in press; Venier et al., 2011; Araya et al., 2010; Mateo et al., 2010; Li et al., 2008; Cellura et al., 2007). Differential gene expression levels associated with immune responses (i.e. antimicrobial peptides and lysozyme genes) was found in *M. galloprovincialis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 (Venier et al., 2011; Li et al., 2008; Cellura et al., 2007). Furthermore, Araya et al. (2010) identify differentially expressed immune genes in *M. arenaria* hemocytes exposed *in vitro* to *V. splendidus* LGP32 using a Suppression Subtractive Hybridization (SSH) approach. These authors found that ficolin, killer cell lectin-like receptor, natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1), mitogen-activated protein kinases (MAPK), ferritin, heat shock proteins 90 (HSP90) and cathepsin exhibited similar gene expression patterns: an up-regulation at 1 h, followed by a down-regulation at 2 and 3 h following bacterial infection. Moreover, an exposition *in vivo* to *V. splendidus* LGP32 induces a down-regulation of Toll-like receptor 2 (TLR-2) and an up-regulation of interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in hemocytes of *M. arenaria* (Mateo et al., 2010). Also, some immune related genes, which play an important role in pathogen recognition, destruction, elimination and detoxification (C1qDC, lysozyme, defensin, mytilin B, multidrug resistance associated protein, proteasome 26S, cyclooxygenase, SOD and GPx) were regulated in *M. edulis* hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 strain (Tanguy et al., in press). These studies demonstrated that *V. splendidus* LGP32 has the capacity to regulate the expression of the genes involved in innate immunity of bivalve mollusks during the first hours of the bacterial challenge.

Understanding how the biological systems of mollusk respond to microbiological challenges is an opportunity to investigate and elucidate the basic physiological principles that rule the defense mechanisms in Mollusks (Bettencourt et al., 2009) and is essential for both scientific and aquaculture. Next generation sequencing technique, in particular *RNA-seq* technology, offer novel and rapid opportunities for analyzed the transcriptome and unravel molecular mechanisms

involved in innate immune system of marine bivalves. The goal of this study is to identify molecular actors involved in the early hemocyte's responses.

In our previous works, the pathogenicity of *Vibrio splendidus* LGP32 for *Mytilus edulis* hemocyte was proven. We have examined the kinetics of morphological (non-adherent hemocyte) and functional (phagocytic activity and oxidative burst activation) responses of *M. edulis*' hemocytes exposed to different strains of *V. splendidus* (Tanguy et al., in press). Also, in order to determine the transcriptome of *M. edulis*' hemocyte exposed to *V. splendidus*, we constructed and sequenced, using 454 pyrosequencing, a normalized cDNA library specific to *M. edulis* hemocytes unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain during 2, 4 and 6 hours (Tanguy et al., submitted). In the present work, the aim is to quantify transcripts levels during bacterial challenge to obtain a kinetic of molecular responses. A next generation *RNA-seq* technology (Illumina sequencing) were conducted on *M. edulis* hemocytes unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain during 2, 4 and 6 hours. Also, the expression level of "candidate" genes was quantified using the multiplex branched technology.

2. Material and Methods

2.1. Mussels and hemolymph collection

Adult blue mussels, *Mytilus edulis* (3 to 5 cm in shell length) were sampled from Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada). Mussels were kept and maintained in a 300 L tank with re-circulating artificial seawater (Instant Ocean[®]) at a temperature of 16-17°C and a salinity of 30 ppt. Animals were fed with Spat Formula (Innovative Aquaculture Products Ltd., Canada) every day.

Hemolymph (1 to 5 ml from each individual) was withdrawn from the adductor muscle using 3 ml syringes fitted with 25 gauge needles. The hemolymph quality of individual mussels was checked using an inverted microscope (ZEISS, Germany). Hemolymph was pooled into a sterilized 30 ml tube and cell concentration in hemolymph was determined using a hemocytometer.

2.2. *In vitro* exposition of *M. edulis*' hemocytes to *V. splendidus* LGP32

One million hemocytes was added to each well of 24 well plates previously filled with 1 ml of L-15 growth media (Leibovitz L-15 medium (Sigma, ON, Canada)). The L-15 was slightly modified by the addition of 20.2 g/l NaCl, 0.54 g/l KCl, 0.6 g/l CaCl₂, 1 g/l MgSO₄, 83 g/l MgCl₂-6H₂O, 10 % of glucose and 10 % of heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS). The cell culture has been incubated for 1 hour at 16°C to enable hemocytes to adhere to the bottom of the wells. Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion method.

Bacteria were cultured overnight to reach exponential growth phase in Trypticase Soy Broth (TSB, BD-Bacto™) supplemented with 2% NaCl at 16°C in 250 mL Erlenmeyer flasks and shaken at 100 rpm. The bacterial concentration was determined using a spectrophotometer (UNICO Spectrophotometer, Biotech, Inc., Québec, Canada) at 540 nm. Bacteria were added to hemocytes at a 1:3 hemocyte:bacteria ratio. The controls represent hemocytes incubated in L-15 media without bacteria. Hemocytes were exposed to bacteria for 2, 4 and 6 hours. For each exposition time, 12 replicates were performed and cell viability was assayed by the trypan blue exclusion technique. More than 90% of the hemocytes were viable before RNA extraction (data not shown).

2.3. RNA extraction and concentration

For each exposure time, total RNA from hemocytes was extracted using a Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, ON, Canada) and eluted in 10 μ l of RNase-free H₂O.

For each exposure time, the 12 samples were pooled. The 120 μ l of RNA was concentrated by addition of 1/10 volume of 3 M of sodium acetate, pH 5.2, and 2.5 volume of ethanol, mixed and placed on ice for 20 minutes. Then, the samples were centrifuged for 15 minutes with *vmax* at 4°C and for each sample the supernatant was completely removed. RNA was washed with 500 μ l of ethanol at 75% and centrifuged for 5 minutes with *vmax* at 4°C. Again, the supernatant was removed and RNA precipitate was dissolved in 15 μ l of RNase-free H₂O.

RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, DE, US) and RNA quality was assessed using the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad Ltd. ON, Canada).

2.4. Illumina sequencing and transcripts analysis

cDNA synthesis and Illumina sequencing was conducted by Genome Quebec at McGill University (Montreal, Canada ; <http://gqinnovationcenter.com/>) with the Illumina HiSeq 2000 technology. The different steps for analysis the generated reads were carried out at genome Quebec.

2.4.1. Read trimming and transcriptome assembly

Read pairs were trimmed by quality using FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Parameters used were trimming 3' at minimum Q-value 20 and discard reads shorter than 93bp.

Then, transcriptome assembly was done with the Velvet-Oases assemblers (Schulz et al., 2012). Picking the kmer for Velvet was performed with VelvetOptimiser. The range to test was from k21 to k101. The kmer that gave the best overall values was k93. The Velvet results were then passed to Oases to rebuild the transcripts. Velvet 1.1.04 was used.

2.4.2. Abundance estimation, differential transcript expression and clustering

Taking the output of velvet we counted which reads were used with which transcripts and converted these counts to RPKM values.

Differential expression analysis between individual time points was conducted using the DESeq package (Anders and Huber, 2010) from the R Bioconductor project (Gentleman et al., 2004). Dispersion estimates were calculated with the “blind” method.

Then, the full list 149,296 assembled transcripts was filtered for variability across time points by retaining only those transcripts with an inter-quartile range of raw read counts in the upper 5% quantile. Raw read counts for the remaining 7,465 transcripts were then standardized. To identify the most important patterns of transcript expression across time, fuzzy clustering was applied as is implemented in the Bioconductor Mfuzz (Kumar and Futschik, 2007; Luan and Li, 2003) package, with the number of clusters arbitrarily set to 10.

2.5. Transcripts analysis

2.5.1. All assembled transcripts

Assembled transcripts were blasted against protein databases (DrugBank Pro protein, Genpept - Translated Genbank, Protein Data Bank, RefSeq, Swiss-Prot, Swiss-Prot varsplic and Translated EMBL), by using MegaSearch strategy at Genomequest (USA). A score cut-off of 30 was applied and results were limited to 5 per query.

Also, to ensure quality of sequencing, Illumina assembled sequences were blast against the 454 normalized library previously obtained from hemocytes unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain during 2, 4 and 6 hours (Tanguy et al., submitted) at Genomequest.

In addition, sequences were submitted to BLAST comparison against the KEGG GENES database to obtain KO (KEGG Orthology) assignments and to generate KEGG pathways. The threshold >60 is applied to BLAST bit scores.

2.5.2. Transcripts in each cluster

To assign a putative function to the assembled sequences for immune related genes, sequences from each cluster were compared against protein databases (DrugBank Pro protein, Genpept - Translated Genbank, Protein Data Bank, RefSeq, Swiss-Prot, Swiss-Prot varsplic and Translated EMBL), using BlastX program at Genomequest. Then, Gene ontology (GO) terms were found from AgBase- GORetriever program (http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goretriever_select.pl) and GO searches were performed on the GO terms using Revigo (<http://revigo.irb.hr/>).

2.6. Microsphere-based Multiplex Branched DNA Assay

This technology enables a high-throughput analysis by quantifying multiple mRNA targets from the same and unique sample (Lee et al., 2009). Multiplex gene expression quantifications is widely used in transcript profiling in human cancer diagnostic (Ching et al., 2011) and has recently been successfully performed in *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* hemocytes (Tanguy et al., in press; Siah et al., 2012).

2.6.1. Cell lysate preparation

At each exposure time, the growth media was carefully removed from wells and 500 μ l of L-15 medium modified and 500 μ l of working lysis mixture (500 μ l Lysis Mixture with 150 μ g of Proteinase K) were mixed. The content was thoroughly vortexed and the plate was incubated at 50°C for 30 minutes to lyse the cells and release target total RNA from the hemocytes. This step was repeated 3 times. Cell lysates were stored at -80°C until use.

2.6.2. Design of probe sets

The assay uses 3 probe sets, namely Capture Extenders (CEs), Label Extenders (LEs), and Blockers (BLs), which are all capable of specifically hybridizing the RNA targets. Different fluorescent beads are coated with CEs, thus enabling hybridization and discrimination among the different RNA targets. LEs probe sets are designed to hybridize the branched DNA thus allowing the signal amplification. Each branched DNA contains multiple hybridization sites for biotinylated Label Probes that bind Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin (SAPE). The combined fluorescence signals resulting from both the capture beads and SAPE are read on a Luminex 100 flow cytometer (Luminex Corp., Austin, CA, US). The design of probe sets was carried out by the manufacturer (Affymetrix Inc., CA, US) from the sequences of 10 “candidate”

transcripts and 3 identified as non-regulated (*Table 1*). The most stable transcript among the 3 non-regulated was used as housekeeping genes.

2.6.3. Target RNA capture

Specific transcripts were captured to their respective beads through a Capture Extender / Capture Probe interaction during an overnight hybridization at 54°C. Briefly, a working bead mixture was prepared by combining 5.2 µl nuclease-free water, 6.6 µl lysis buffer, 2 µl blocking reagent, 0.2 µl proteinase K, 1 µl capture beads and 5 µl of probe sets per well in a 96-well-plate. A total volume of 20 µl of working bead mix was dispensed into each well of the hybridization plate, and 80 µl of diluted cell lysate was added. The plate was then sealed and placed into a shaking incubator at 54°C overnight.

2.6.4. Signal Amplification and Detection

To develop the amplified signal, the alkaline phosphatase substrate dioxetane (QuantiGene® 2.0 system, Affymetrix, Inc., CA, USA) was added to the wells and incubated at 50°C for 1 hour. The signal was detected using a Luminex 100 flow cytometer (Luminex Corp., Austin, CA, US). Nuclease free water was used for the background quantification instead of the total RNA. The average median fluorescence was subtracted from the background and normalized to the housekeeping genes.

2.6.5. Statistical analysis

Relative transcripts levels data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA; SigmaStat 2.03) to determine the significance between the different experimental conditions in each assay. Student's t-test (SigmaStat 2.03) was used to compare exposed groups (2, 4 and 6 h)

with the control group (0 h). Results are expressed as the mean \pm standard deviation, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Illumina sequencing and reads assembly

cDNAs from hemocytes of *M. edulis* exposed to *V. splendidus* LGP32 during 0 (control), 2, 4 and 6 hours were sequenced with the Illumina HiSeq 2000 sequencing technology.

A total of 141,241,930 nucleotide reads was generated which represented 15.254×10^9 bases sequenced. An average of 35,310,483 nucleotides reads for each condition (0, 2, 4 and 6 h) was obtained. After, a trimming step, all the generated reads were submitted to Velvet-Oases assemblies. A total of 149,296 assembled sequences were generated with an average length of 698.6 bp. The shortest and longest assembled reads were 100 bp and 15,154 bp, respectively (*Figure 1*). Most of the assemblies ranged between 100 and 800 bp in length.

3.2. Annotation

For annotation purposes, similarity searches on non-redundant (nr) proteins sequence databases were performed using MegaSearch program.

A total of 87,114 hits was obtained which had a calculate e-value lower than 10^{-5} . These sequences covered 1,248 different organisms. Several query sequences had best hits with subjects

in *Mytilus species* (3,261 hits) and to *Vibrio species* (525 hits). For 2,213 sequences, the match between the assembled transcripts and sequences listed in Genbank was perfect. This was in particular the case for *Mytilus species* (341 perfect matches) and for *Vibrio splendidus* (306 perfect matches), suggesting a good accuracy and quality of sequencing and assembly. Only the very best hit for each query sequence was kept for further analysis. For these 18,645 selected best hits, the resulting e-values ranged from 2 to 0. A total of 18,445 of these best hits had an e-value lower than 10^{-5} .

These Illumina sequences were submitted to a blast search against cDNAs from a 454 normalized library previously obtained from hemocytes unchallenged (control) and challenged with *V. splendidus* LGP32 strain during 2, 4 and 6 hours (Tanguy et al., submitted). 71,436 assembled Illumina sequences matched the assembled 454 sequences. For 210 Illumina sequences, the match with 454 sequences was perfect (%Id=100) and for a lot of sequences this match was very high (4,697 sequences with %Id \geq 95), suggesting a good quality of sequencing and assembling.

The set of 149,296 sequences we isolated is likely to cover the major part of *M. edulis* hemocytes transcriptome, even though some sequences were very likely to be related to *Vibrio*. Functional annotation revealed several transcripts bearing similarities with sequences identified as encoding polypeptides involved in the immune response to pathogens in other species. Because of the important role in ecology and economy and their use as sentinel species in ecotoxicological investigations, genome of *Mytilus species* are more and more studied (Philipp et al., 2012; Venier et al., 2011). However, annotations found in this study can only suggest putative functions.

Sequences were also submitted to BLAST comparison against the KEGG GENES database to obtain KEGG Orthology (KO) assignments and to generate KEGG pathways. Results are shown in Table 2. Among the nucleotide sequences, we found transcripts related to cell metabolism and cell cycle which may reflect a role in hemocytes homeostasis. Transcripts related to signal transduction, signaling molecules and interactions, implicated in the regulation of immune

system, as well as to cell adhesion and communication were also highlighted. Furthermore, the *M. edulis* hemocyte transcriptome exposed to *V. splendidus* LGP32 revealed transcripts encoding polypeptides involved in cellular processes such as defense mechanisms related to phagocytosis events, regulation of actin cytoskeleton, autophagy and apoptosis.

3.3. Identification of immune-related transcripts in *M. edulis* hemocytes

3.3.1. Pathogen recognition receptors (PRRs)

The first line of defense starts outside the cell, via the recognition of pathogens by hemocytes to prevent infection. Lectins are glycan-binding proteins that function in the recognition of a wide variety of glycan structures (Fujii et al., 2012). Several lectins with characteristic structures have been described in bivalves, including C-type lectins and galectins (Kim et al., 2008; Tasumi and Vasta, 2007), fibrinogen-type (Gorbushin et al., 2011), and F-type lectins (fuclectin) (Chen et al., 2011). As in our previous study (Tanguy et al., submitted), homologues with only two types of lectins were annotated: 21 of which corresponded to Galectin and 107 to Fibrinogen related proteins (FREPs-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-9). Galectins are characterized by a conserved sequence motif in their carbohydrate recognition domain and a specific affinity for β -galactosides. FREPs contain in the C-terminal portion fibrinogen-like domains but differ in the N-terminal region. Very diverse set of FREP sequences among and within individuals are known in *M. edulis*, suggesting the capacity to recognize and eliminate different kinds of pathogens (Romero et al., 2011).

Toll-like receptors (TLRs) are PRRs which recognize bacteria, fungi and viruses on the cellular surface. A single TLR was identified in *Chlamys farreri* (CfToll-1), *Mya arenaria* (TLR-2) and *Crassostrea gigas* (CgToll-1) (Zhang et al., 2011; Mateo et al., 2010; Qiu et al., 2007) and 2 transcripts in *M. galloprovincialis* (Venier et al., 2011). More recently, TLR-2, 6 and 13 were detected by pyrosequencing of *Ruditapes philippinarum* hemocytes (Moreira et al., 2012) and 27

putative TLR were identified in *M. edulis* transcriptome (Philipp et al., 2012). In our stimulated hemocytes studies, we found blastX relevant similarities for 8 sequences with TLR of *C. farreri*. Also, a total of 27 KO was associated with TLRs pathways (Table 2) and showed sequences homologies with TLR-1,-2,-4 and other proteins such as MyD88 which acts as adaptor molecule for different TLRs, IRAK-4, TRAF-6 (Figure 2). As in our previous work (Tanguy et al., submitted) and in accordance with Philipp et al. (2012), many components of the MyD88 dependent TLR pathway were found whereas fewer components for MyD88-independent pathway were detected.

Recently, Duperthuy et al. (2011) showed that *V. splendidus* LGP32 is a facultative intracellular pathogen. It would be interesting to study whether *M. edulis* has intracellular PRRs for the intracellular recognition of bacterial motifs. NOD-like receptors (NLRs) play a major role in the recognition of intracellular bacteria to generate immune responses. No NLRs were reported in *M. edulis* transcriptome from different tissues subjected to immune challenge and in stressed individuals (Philipp et al., 2012). In the present study, 16 KO were linked with the NLRs pathways (Figure 3). However, as for Philipp et al. (2012) libraries, key constituents of the NLR pathway were lacking, such as RIP2 (receptor-interacting protein kinase 2) and ASC (apoptosis-associated speck-like protein), which act as adaptor molecules for different NLRs (Rosenstiel et al., 2008), as well as Caspase 1, a key molecule activated by inflammasome forming NLRs (Bortoluci and Medzhitov, 2010).

Finally, a really high representation of sequences related to complement component 1q (C1q) were also found (209 sequences related to MgC1q from *M. galloprovincialis*). In vertebrates, the C1q proteins are involved in various cellular processes and display many functions in immunity (Beutler, 2004). They have been identified in bivalves as involved in the recognition of invading microorganisms, probably as pattern recognition molecules (Zhang et al., 2008; Wang et al., 2009; Venier et al., 2011).

3.3.2. Transcription factors

The nuclear factor-kappa B (NF- κ B)/REL family of transcription factors plays a central role in coordinating the expression of a wide variety of genes that control cellular process such as proliferation, survival and immunity (Li et Verma, 2002). The members of the NF- κ B family are normally kept inactive in the cytoplasm by interaction with inhibitors called inhibitor kappa B (I κ B) (Vallabhapurapu and Karin, 2009). A wide variety of signals such as PRRs, receptors for the members of tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) cytokine families, and others lead to NF- κ B activation (*Figure 4*). Homologues of NF- κ B and some components of its signal pathway have been identified in bivalves (Philipp et al., 2012; Venier et al., 2011; Green and Barnes, 2009; Roberts et al., 2009; Montagnani et al., 2004; Gueguen et al., 2003). In our study, homologies for 9 sequences with NF- κ B were found and 26 KO were linked with the NF- κ B pathway (*Figure 4*) showing homology to the Rel family member p50.

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) constitute a well known signaling pathway that regulates diverse cellular mechanisms. This superfamily comprises three main protein kinase families: the extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs), the c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the p38 family of kinases (Cowan and Storey, 2003). Each has major roles in various cellular process including growth, cell cycle, apoptosis, cellular responses to external stresses (Travers et al., 2009). Activation of MAPK cascade and others kinases in responses to bacteria has been identified in hemocytes of various bivalves (Travers et al., 2009; García-García et al., 2008; Canesi et al., 2002, 2005; Cao et al., 2004). Also, the ability of bacteria to modulate immune responses in molluscs has been attributed to the activation or interference of the MAPK signaling pathway (Travers et al., 2009; Canesi et al., 2005). In the present study, 26 sequences were identified as potentially encoding MAPKs, 2 corresponded to p38 and one with JNK and components of MAPK signaling pathway were well present in *M. edulis* with 75 KO associated (*Figure 5*).

3.3.3. Cytokine and JAK/STAT pathway

Cytokines are soluble factors involved in the immune responses mediating the interactions between different cell types (Ottaviani, 2006). In invertebrates, the major mammalian cytokines like interferon (IFN) or interleukins (IL) did not yield a high number of identified (Philipp et al., 2012). However, Philipp et al. (2012) identified sequences encoding for IL-17 and IL-16 in *M. edulis* transcriptome. Also, from a Pacific oyster (*C. gigas*) hemocyte cDNA library, two clones were obtained that likely encoded a protein similar to vertebrate IL-17s and their expression was found to be stimulated by a mixture of bacteria (Roberts et al., 2008). In this study, no sequences related to IFN or IL were identified. However, cytokine receptor and cytokine-induced protein categories related to inflammation were evidenced with 7 sequences encoding for IL-1 receptor associated kinase 4 and a sequence related to Interferon induced protein 44.

Among the cytokines, members of Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily were well represented. In vertebrate species, TNF- α and their receptors form a large group involved in various immune pathways (Goetz et al., 2004). In bivalves, several studies described the response of hemocytes on vertebrate TNF- α and hypothesized the occurrence of this cytokine and related receptors (Philipp et al., 2012; Park et al., 2008; Yu et al., 2007; Hughes et al., 1991). In stimulated hemocytes, BlastX searches led to the identification of 7 sequences related to TNF- α -induced protein 3 and 8 TNF receptor-associated factor 3. Transcripts likely to encode TNF receptor adaptor proteins such as TRAF proteins: TRAF4-associated factor 2 (4 sequences) and TRAF6 (2 sequences) were also highlighted.

The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway is a conserved pathway induced by cytokines. Following the binding of cytokines to their cognate receptor, STATs are activated by members of the JAK family of tyrosine kinases. Once activated, they dimerize and translocate to the nucleus and modulate the expression of target genes involved, with others, in immune reactions. In addition to the activation of STATs, JAKs mediate the recruitment of other molecules such as the MAP kinases, PI3 kinase etc. Previous studies in

M. edulis using mammalian STAT antibodies and IFN as a stimulant, already suggested the occurrence of the JAK/ STAT pathway in bivalves (Philipp et al., 2012). These authors found contigs with similarity to JAK2 and STAT in *M. edulis*. In our study, 20 KO appeared to be linked to this pathway (*Figure 6*) and JAK and STAT seemed to be present in hemocytes of *M. edulis*. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) refers to a family of genes involved in inhibition of the JAK/STAT pathway which is essential to control cytokine production and other immune responses. SOCS was also represented among the illumina sequences (6 sequences related) and similar results have already been documented in *M. edulis*, with the highest expression being in gills (Philipp et al., 2012). As shown in *Figure 6*, no transcript coding for cytokine and cytokine receptor known to activate JAK were detected in *M. edulis*.

3.3.4. Protease inhibitors and stress proteins

V. splendidus LGP32 secrete extracellular metalloproteases whose toxicity has been demonstrated (Binesse et al., 2008; Le Roux et al., 2007). Overall, pathogen proteases are important virulence factors that facilitate infection, diminish the activity of lysozymes and quench the agglutination capacity of hemocytes (Moreira et al., 2012). Many bivalves have developed protease inhibitors to protect themselves via the direct inactivation of pathogen proteases (Gestal et al., 2008). Among these protease inhibitors, Cg-TIMP which targets metalloproteases was shown to be induced by a mixture of *Vibrio* in oysters *C. gigas* (Montagnani et al., 2001, 2007). No significant similarity with a TIMP could be detected in the present assemblies. However, 51 sequences bearing similarities with various protease inhibitors such as serpins, alpha-macroglobulin and Serine, Cysteine, Kazal-type protease inhibitor were found.

Various sequences of stress proteins were found with high representation, including various heat shock proteins (HSPs) family and mussels' metallothioneins (MTs). The HSPs proteins family is one of the most conserved and important systems for cellular homeostasis under both stress and physiological conditions (Kourtidis et al., 2008). Besides of being molecular chaperones, HSPs

have also a number of significant functions in the innate immune response (Wallin et al., 2002) and they are well studied in bivalves (Cellura et al., 2006 ; 2007; Song et al., 2006; Franzellitti et Fabri, 2005; Piano et al., 2004; Boutet et al., 2003). MTs are metal-binding stress response proteins which are involved in detoxification of heavy metals, in regulation of physiological metals and in protection against oxidative stress. In mammals, MTs have also been shown to play a role in host defense against a pathogen (Emeny et al., 2009).

Diverse families of antimicrobial peptides (AMPs) have been described in mussels and were highly represented in our set of assembled sequences. We found sequences homologies with MGD2b, mytilin B, C and D, myticin A, B and C and mytimycin. These peptides can provoke the destruction of bacteria inside phagocytes by altering the permeability of the pathogen membrane and cause cellular lysis, before being released by exocytose into hemolymph to participate in systemic responses (Li et al., 2008; Mitta et al., 1999).

3.3.5. Cell adhesion and communication

Transcripts related to cell adhesion and communication were also annotated. Among them, beta-integrin, different type of collagen, collagen-receptors and procollagen, transmembrane proteins, fibrillins and laminin receptors were found. In oysters, beta-integrin was shown to play an important role in phagocytosis (Terahara et al., 2006). Interestingly, *V. splendidus* LGP32 uses beta-integrin through its outer membrane protein OmpU to invade oyster hemocytes and further impair defense functions (Duperthuy et al., 2011). Integrins play also a role in the attachment of extracellular proteins, such as collagen, to cell membranes. Collagen is a fundamental protein component in connective tissues of multicellular animals, playing mechanical and physiological roles, such as maintaining tissue integrity and cohesion (de Logeril et al., 2011; Mizuta et al., 2004). De Logeril et al. (2011) suggest a potential role of collagen to repair the lesions caused by virulent *Vibrio* infection. In addition, the laminin receptors (LRs) play important roles in cell adhesion to the extracellular matrix, in cell to cell adhesions, and in the activation of many

intracellular signaling pathways. Recently, a study on LR of the bivalve *Meretrix meretrix* demonstrated a role of LR in cell adhesion and apoptosis (You et al., 2012).

3.3.6. Phagocytosis and cytoskeleton rearrangements

Phagocytosis plays an essential role in host-defense mechanisms via the uptake and subsequent destruction of infectious pathogens. During the phagocytosis process, phagosomes are formed and progressively acquire digestive characteristics. Fusion of phagosomes to lysosomes enables the release of toxic products that kill most and degrade most bacteria. As in our previous work (Tanguy et al., submitted), a lot of (45) KO were associated with the phagosome (*Figure 7*) and up to 71 with the lysosome (*Figure 8*). Among these, transcripts related to cathepsins, sulfatases and lipases were listed.

The cytoskeleton is a cellular network of structural, adaptor and signaling molecules that regulates most cellular functions that are related to the immune response, including migration, recognition, activation and also phagocytosis and intracellular transports (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Thus, actin cytoskeleton changes are also involved in host-pathogen interactions (de Logervil et al., 2011). A high numbers of sequences appeared to be related to cytoskeleton rearrangement (several actin related molecules, Cdc42, fascin, calponin...): 56 KO were associated with the regulation of actin cytoskeleton (*Figure 9*). A number of studies conducted in bivalve species have indicated that *Vibrio* species, known to be pathogenic to bivalves, are able to subvert the actin cytoskeleton by disrupting the ability of hemocytes to adhere and to provoke cell rounding (Tanguy et al., in press; Araya et al., 2009; Mateo et al., 2009; Labreuche et al., 2006a; Choquet et al., 2003; Lane and Birkbeck, 1999, 2000). OmpU which play a key role in *V. splendidus* LGP32 virulence was shown to subvert the host cell actin cytoskeleton, resulting in actin and clathrin polymerization and thus enabling bacterial invasion and survival into host cells (Duperthuy et al., 2011). Molecular actors of cytoskeleton rearrangement are thus actors of cellular defense mechanisms but may also constitute targets for *Vibrio* virulence.

3.3.7. Oxidative stress

Oxidative stress is caused by an imbalance between production of reactive oxygen species and a biological system's ability to readily detoxify the reactive intermediates or easily repair the resulting damages. Transcripts related to respiratory chain (cytochrome c oxidase (different subunit), cytochrome b, palmitoyl-CoA oxidase) and particularly in ROS production such as NADH dehydrogenase were annotated among the sequence assemblies. In the cascade of events taking place during the host immune response, production of cytotoxic ROS is a general protective mechanism in most animal species and constitutes a critical step during which potential pathogens and parasites are eliminated following phagocytosis. To protect living cells from damage caused by endogenous ROS, organisms use scavenging and enzymatic activities to eliminate free radicals by converting them to less toxic compounds (Yu et al., 2011). Transcripts encoding for antioxidant proteins such as glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, serine/threonine-protein kinase, membrane selenoprotein P, catalase were clearly identified as part of the hemocyte transcriptome. In *M. edulis* hemocytes, oxidative burst has been shown to be enhanced following *V. splendidus* LGP32 exposition while superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNAs were down-regulated. This mechanism may reflect a pathogen adaptation aiming at impairing hemocyte proper functioning and survival (Tanguy et al., in press).

3.3.8. Apoptosis and Autophagy

Programmed cell-death is a fundamental response to immune stress. Besides activation by inflammatory pathways such as TNF- α or Fas, apoptosis and autophagy can be triggered by ROS (Fulda et al., 2010).

Apoptosis plays a key role in immune system homeostasis and function, both in vertebrates and invertebrates (Kiss, 2010; Sokolova, 2009). A key characteristic of the majority of apoptotic pathways is the involvement of a family of proteases called caspases that cleave target proteins at specific sites (Creagh et al., 2003). In *M. edulis* transcriptome, various apoptosis related

transcripts such as caspases and Fas-associated death domain (FADD) have already been identified (Tanguy et al., submitted). Sequences encoding known effectors or regulators of apoptosis were detected. These included pro- or anti-death effectors such as various caspases (129 sequences related), cytochrome c (36 sequences related) or inhibitors of apoptosis (IAPs) (40 sequences related). A total of 24 KO were associated with apoptosis pathways (*Figure 10*).

Autophagy is a conserved mechanism which plays role in direct elimination of intracellular pathogens by digestion in autolysosomes. Main players include mTOR (target of rapamycin) which is a key inhibitor of autophagy, and the large group of autophagy-related genes (ATGs), responsible for autophagy induction and autophagosome formation (Philipp et al., 2012). ATGs have recently identified as antimicrobial effectors of Toll-like receptors and other PRR signaling pathways (Delgado et al., 2009). As an example, LC3 (ATG8) is clearly involved in phagocytosis of pathogens (Sanjuan et al., 2007). In mussels challenged and stressed, indication to a well developed autophagy machinery was shown with identification of ATGs, beclin-1 (ATG6) and mTOR (Philipp et al., 2012). In the present study, sequences with homologies with some ATG family members, beclin-1 and mTOR were also found.

3.4. Differential transcript expression and clusterisation

3.4.1. Short-term kinetics of transcript levels in hemocytes during *Vibrio* exposure for each cluster

The full list of the 149,296 assembled transcripts was filtered. Then, the remaining 7,465 transcripts expression was standardized in z-score. After that, fuzzy clustering was applied to identify the most important patterns of transcript expression across time. The kinetics of transcripts levels of the 10 clusters is shown in *Figure 11*.

Overall, after 2 hours of exposure, compared to control (0 hour = hemocytes incubated without bacteria), transcripts from clusters 2, 3, 6, 10 were up-regulated and transcripts from clusters 4, 5, 8, 9 were down-regulated. Transcripts from clusters 1 and 7 looked non-regulated (*Figure 11*).

After 4 hours of exposure, compared to control (0 hour), an up-regulation was observed for sequences from clusters 2, 6, 7, 10 and a down-regulation for transcripts from clusters 1, 3, 8, 9. No expression changes compared to control (0 hour) was observed for transcripts from sequences 4 and 5 at 4 hours of exposure (*Figure 11*).

After 6 hours of exposure, compared to control (0 hour), transcripts from clusters 1, 2, 5 and 6 were up-regulated, transcripts from clusters 3, 4, 8 and 9 were down-regulated and transcripts from clusters 7 and 10 seemed to return to the level of control transcript number (*Figure 11*).

3.4.2. Annotation and Gene Ontology Analysis for each cluster

A BlastX was performed on each sequence of the 10 clusters. Gene ontology (GO) terms were then extracted and GO terms analysis was conducted using GORetriever and Revigo programs. Gene Ontology (GO) has been widely used to perform gene classification and functional annotation using controlled vocabulary and hierarchy including molecular function, biological process and cellular components (Bard et al., 2004). The sequences were successfully assigned to biological process, cellular component, and molecular function GO categories. Distributions of the GO term for the biological process category for each cluster are shown in *Table 3* which gives an overview of major biological process found in the different clusters.

In the most of the 10 clusters, sequences related to stress and immunity were found. Some sequences were actually found in different clusters, and did have similarities with a same protein. This was in particular the case for sequences related to actin, Myticin C, C1q and various HSPs which were found in at least 7 different clusters. High throughput sequencing technologies allow sequencing of relatively short DNA fragments and *in silico* assembly of sequences does not necessarily cover the full cDNA. Alternately, splice variants are likely to be similar to the very

same ortholog when performing blast or balstx searches. Thus, different transcripts from a same gene can be found in different clusters. Also, previous investigations of immune system parameters in bivalve have revealed the existence of a high diversity or polymorphism within some gene families such as C1q (Venier et al., 2011; Gestal et al., 2010) and Myticin C (Balseiro et al., 2011). In the present study, the high number of transcript fragments reported for some genes families in different clusters whether may represent real single genes, may result from assembly artifacts, represent variants of the same genes or the existence of a individual polymorphism.

Transcripts with GO terms related to translation and transport were abundant in all clusters (*Table 3*). These transcripts included sequences related to ribosomal proteins and ribosome-mediated processes such as elongation and initiation factors. The high representation of these GO terms indicates a strong regulation of translation in hemocytes. GO terms assigned to transport represented transcripts related to directed movement of substances (such as macromolecules, small molecules, ions) into, out of or within a cell, or between cells, or within a multicellular organism by means of some agent such as a transporter or a pore. Oxidation-reduction process and various metabolic processes were also highly represented which may reflect a role in hemocytes homeostasis.

Transcripts with GO terms related to stress response were found in clusters 1 to 5 and in cluster 8 (*Table 3*). These terms represented mainly transcripts related to HSPs. As discuss before, various HSPs were found in our transcriptome and were identified as differentially regulated. GO terms linked to innate immune response were found in clusters 2, 3 and 4 and GO term corresponding to defense response to bacterium were found in clusters 3, 4 and 6 (*Table 3*). The most interesting immune-related transcripts were found in clusters 2 to 6. Interestingly, kinetics of transcripts levels in clusters 2 and 3 presented the same pattern, an up-regulation at 2 hours following by down-regulation at 4 and 6 hours (*Figure 11*). In these clusters, transcripts encoding for some galectins and FREPs, for molecules of TLR pathways as MyD88 and TLR, for some cytokines related such as IL-1 receptor associated kinase 4, for antimicrobial peptides such as Mytilin A, B and C, for various actin and collagen, for some lysosomal acid hydrolases such as cathepsins, for

NADH dehydrogenase and for inhibitor of apoptosis protein were found. In cluster 4, transcripts related to FREPs and galectins, protease inhibitors such as Kazal-type serine protease inhibitor, lysozyme and various AMPs were present. In clusters 5 and 6, principally transcripts encoding for oxidative stress and various AMPs were present.

3.5. “Candidate” transcript levels in hemocytes during *Vibrio* exposure

Differential levels of 10 targets transcripts selected as “candidates” in hemocyte responses to *V. splendidus* LGP32 strain at 2, 4 and 6 hours from each cluster were normalized, quantified, and compared with the mean expression in control samples (0 hour) (*Figures 12*).

Overall, compared to control (hemocytes incubated without bacteria), significant differential levels in hemocytes exposed to *V. splendidus* LGP32 were observed for 5 target transcripts (*Figure 12A*). Standard deviation for control were relatively important (around 0.5). This likely reflects a strong variability between samples. In hemocytes exposed to *V. splendidus* 7SHRW, significant differential levels were observed for 7 transcripts (*Figure 12B*). These observations appear to be contradictory with our previous studies where we found that the environmental 7SHRW strain induced weak and delayed hemocytes responses compared to *V. splendidus* LGP32 strain (Tanguy et al., in press). These results suggest that both *V. splendidus* strains can modulate the mRNAs expression in *M. edulis* hemocytes. The lack of hemocytes response (or lower responses) to LGP32 strains for the mRNAs studied may reflect molecular process of pathogenicity of LGP32 strain to avoid immune defense of hemocytes.

Inhibitor kappa B (I κ B) mRNA was significantly ($p < 0,01$) up-regulated after 4 h of exposure to *V. splendidus* LGP32 and after 2, 4 and 6 h of exposure to *V. splendidus* 7SHRW. I κ B is an important member of NF- κ B pathway in the innate immune system. In *A. irradians*, 3 hours of *Listonella anguillarum* infection inhibited the transcription level of AiI κ B (Mu et al., 2010).

These results suggest an involvement of I κ B in the responses of bivalves against bacterial infection. These responses seem to be modulated upon the host and the bacteria species.

Transcript encoding for heat shock cognate 71 (Hsc71) was significantly ($p < 0.001$) up-regulated at 4 h of exposure to 7SHRW strain. Heat shock cognate 71 belongs to the heat shocks proteins (HSPs) family. The Hsc70s are constitutively expressed (Lindquist and Craig, 1988). The over-expression recorded in hemocytes would suggest that Hsc71 is involved in the early-stages of hemocyte-*Vibrio* infection to maintain homeostasis.

mRNAs encoding for cell division cycle 42 (Cdc42) were significantly ($p \leq 0.001$) up-regulated at 2, 4 and 6 h of exposure to 7SHRW strain. The Cdc42 protein encoded by this gene is a small GTPase of the Rho-subfamily, which regulates signaling pathways that control diverse cellular functions including cell morphology, migration, endocytosis and cell cycle progression. This protein could regulate actin polymerization during phagocytosis. Indeed, during Fc- γ -dependent uptake (also referred as type I), activation of Rac1 and Cdc42 is thought to drive the formation of local pseudopods and membrane ruffles that engulf the particles (Dupuy and Caron, 2008). The increase of mRNAs Cdc42 during *Vibrio* challenge could reflect the activation of Cdc42 in hemocytes for phagocytosis. No significant variations for Cdc42 transcripts were observed with the LGP32 strain. This result correlates well the reduced phagocytosis observed in *M. edulis* hemocytes exposed to LGP32 (Tanguy et al., in press),

Transcript encoding for inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) was significantly ($p < 0,05$) up-regulated at 4 and 6 hours of exposure to *V. splendidus* LGP32 and at 2, 4 and 6 hours of exposure to *V. splendidus* 7SHRW. Apoptosis system was reported to play important role in organism immunity. The IAPs proteins are composed of Baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat (BIR) domains. In higher eukaryotes, BIR domains inhibit apoptosis by acting as direct inhibitors of the caspase family of protease enzymes (Zhang et al., 2011). The over-expression of IAPs recorded in hemocytes would suggest that IAPs regulate apoptosis activated during *Vibrio* challenge.

Tumor protein D54 (or her alternative name Tumor protein D52-like2) mRNAs was significantly up-regulated at 4 h of exposure ($p < 0,05$) to both *V. splendidus* strains. Tumor protein D52-like proteins are small coiled-coil motif bearing proteins which are conserved from lower organisms to human. TPD52 and related proteins have been shown to be involved in cell proliferation, apoptosis, and vesicle trafficking (Cao et al., 2006). The up-regulation of tumor protein D54 transcript may reflect needs for hemocytes to one or several of these fundamental mechanisms.

Serine/threonine-proteine kinase SIK2 transcript was significantly ($p < 0,05$) up-regulated at 2, 4 and 6 h of exposure to both strains. Salt-inducible kinase 2 (SIK2) is a serine/threonine protein kinase that belongs to the AMP-activated protein kinase (AMPK) family, constituents of which are regarded as important mediators of energy and stress signaling. In human, the kinase activity of SIK2 has been shown to regulate a number of signaling pathways (Yang et al., 2013). The over-expression of SIK2 in hemocytes of *M. edulis* suggests a possible action of SIK2 to regulate signaling pathways.

Polyadenylate binding protein 1 (PABP1) mRNAs was significantly ($p < 0,05$) up-regulated at 4 and 6 h of exposure to *V. splendidus* LGP32 and at 2 and 4 h to *V. splendidus* 7SHRW. PABP1 binds poly(A) tails of mRNA. Poly(A)-binding protein promotes export from the nucleus and translation, and inhibits degradation (Coller et al., 1998). The over-expression recorded in hemocytes would suggest that PABP1 is involved in the early-stages of hemocyte-*Vibrio* infection to answer to increase translation.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Frédérique Le Roux (IFREMER) for providing the bacterial strain LGP32. This program and the doctoral fellowship of Marion Tanguy were supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Institute of Marine Science (University of Quebec at Rimouski), PEI Innovation and the Canadian Fund for Innovation.

References

- Anders S., Huber W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data, *Genome Biology*, 11(10): R106.
- Akira S., Takeda K., Kaisho T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nature Immunology*, 2(8): 675-680.
- Araya M.T., Markham F., Mateo D.R., McKenna P., Johnson G.R., Berthe F.C., Siah A., 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*, *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 557-564.
- Araya M.T., Siah A., Mateo D.R., Markham F., McKenna P., Johnson G.R., Berthe F.C.J., 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*, *Journal of Shellfish Research*, 28 (4), 751-758.
- Arumugam M., Romestand B., Torreilles J., Roch P., 2000. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis, *European Journal of Cell Biology*, 79: 513-519.
- Auffret M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63: 393-405.
- Balseiro P., Falcó A., Romero A., Dios S., Martínez-López A., Figueras A., Estepa A., Novoa B., 2011. *Mytilus galloprovincialis* Myticin C: A Chemotactic Molecule with Antiviral Activity and Immunoregulatory Properties, *PLoS ONE*, 6: e23140.
- Bard J.B.L., Rhee S.Y., 2004. Ontologies in biology: design, applications and future challenges, *Nature Reviews*, 5: 213-222.
- Bettencourt R., Dando P., Collins P., Costa V., Allam B., Serrão Santos R., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 152, 278-289.
- Beutler B., 2004. Innate immunity: an overview, *Molecular Immunology*, 40: 845-859.

- Binesse J., Delsert C., Saulnier D., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M., Munier-Lehmann H, Mazel D., Le Roux F., 2008. Metalloprotease *vsm* is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 7108-7117.
- Bortoluci K., Medzhitov R., 2010. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 1643-1651.
- Boutet I., Tanguy A., Rousseau S., Auffret M., Moraga D., 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Cell Stress & Chaperone*, 8: 76-85.
- Buggé D.M., Hégaret H., Wikfors G.H., Allam B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes, *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 188-196.
- Cai J., Li J., Thompson K.D., Li C., Han H., 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, *Journal of Basic Microbiology*, 47: 84-86.
- Canesi L., Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Gallo G., Pruzzo C., 2005. Interactions between *Mytilus* haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* O1 El Tor: role of kinase-mediated signaling, *Cellular Microbiology*, 7: 667-674.
- Canesi, L., Gavioli M., Pruzzo C., Gallo G., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves, *Microscopy Research and Technique*, 57: 469-476.
- Cao A., Ramos J.A., Barcia R., 2004. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. By LPS and IL-2, *Molecular Immunology*, 41: 45-52.
- Cao Q., Chen J., Zhu L., Liu Y., Zhou Z., Sha J., Wang S., Li J., 2006. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3): 798-806.
- Cellura C., Toubiana M., Parrinello N., Roch P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels, *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 340-350.
- Cellura C., Toubiana M., Parrinello N., Roch P., 2006. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*, *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 984-997.
- Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J.A., Bulet P., 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*, *The Journal of Biochemical Chemistry*, 271: 21808-21813.
- Chen J., Xiao S., Yu Z., 2011. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*), *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2):750-754.

- Cheney D.P., MacDonald B.F., Elston R.A., 2000. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, *Journal of shellfish research*, 19: 353-359.
- Ching L.K., Mompoin F., Guderian, J.A., Picone A., Orme I.M., Coler R.N., Reed S.G., Baldwin S.L., 2011. Transcriptional profiling of TLR-4/7/8-stimulated guinea pig splenocytes and whole blood by bDNA assay, *Journal of Immunological Methods*, 373 (1-2), 54-62.
- Choquet G., Soudabt P., Lambert C., Nicolas J-L., Paillard C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* haemocytes exposed to *Vibrio tapetis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 109-116.
- Coller J.M., Gray N.K., Wickens M.P., 1998. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation, *Genes & Development*, 12: 3226-3235.
- Costa M.M., Prado-Alvarez M., Gestal C., Li H., Roch P., Novoa B., Figueras A., 2009a. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen associated molecular patterns and bacteria, *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 515-523.
- Cowan K.J., Storey K.B., 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress, *The Journal of Experimental Biology*, 206: 1107-1115.
- Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J., 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity, *Immunological Reviews*, 193: 10-21.
- Delgado M., Singh S., De Haro S., Master S., Ponpuak M., Dinkins C., Ornatowski W., Vergne I., Deretic V., 2009. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity, *Immunological Reviews*, 227: 189-202.
- de Lorgeril J., Zenagui R., Rosa R.D., Piquemal D., Bachère E., 2011. Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression Analysis, *PLoS ONE*, 6 (8): e23142.
- De Zoysa M., Whang I., Nikapitiya C., Oh C., Cheol Y.C., Lee J., 2011. Transcriptional analysis of disk abalone (*Haliotis discus discus*) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge, *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 155-160.
- Duperthuy M., Schmitt P., Garzón E., Caro A., Rosa R.D., Le Roux F., Lautrédou-Audouy N., Got P., Romestand B., de Lorgeril J., Kieffer-Jaquinod S., Bachère E., Destoumieux-Garzón D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 2993-2998.
- Dupuy A.G. Caron E., 2008. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts, *Journal of Cell Science*, 121(Pt 11): 1773-1783.
- Emeny R.T., Marusov G., Lawrence D.A., Pederson-Lane J., Yin X., Lynes M.A., 2009. Manipulations of metallothionein gene dose accelerate the response to *Listeria monocytogenes*, *Chemico-Biological Interactions*, 181: 243-253.
- Franzellitti S., Fabri E., 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336: 1157-1163.

- Fujii Y., Dohmae N., Takio K., Kawsar S.M.A., Matsumoto R., Hasan I., Koide Y., Kanaly R.A., Yasumitsu H., Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Nitta K., Hamako J., Matsui T., Ozeki Y., 2012. A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 44772-44783.
- Fulda S., Gorman A.M., Hori O., Samali A., 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death, *International Journal of Cell Biology*, Article ID 214074, 23 pages.
- García-García E., Prado-Álvarez M., Novoa B., Figueras A., Rosales C., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families, *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 637-653.
- Gay M., Berthe F., Le Roux F., 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 59: 49-56.
- Gay M., Berthe F., Le Roux F., 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations, *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 49-56.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biology*, 5(10): R80.
- Gerdol M., Manfrin C., De Moro G., Figueras A., Novoa B., Venier P., Pallavicini A., 2011. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules, *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 635-643.
- Gestal C., Pallavicini A., Venier P., Novoa B., Figueras A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus Galloprovincialis*, *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 926-934.
- Gestal C., Roch P., Renault T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Oubella R., Venier P., Figueras A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics, *Reviews in Fisheries Science*, 16 (1): 133-156.
- Goetz F.W., Planas J.V., MacKenzie S., 2004. Tumor necrosis factors, *Developmental & Comparative Immunology*, 28: 487-497.
- Gómez-León J., Villamil L., Lemos M.L., Novoa B., Figueras A., 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet Shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 98-104.
- Gorbushin A.M., Iakovleva N.V., 2011. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*, *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1): 434-438.
- Gourdon I., Guérin M.C., Torreilles J., Roch P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 5: 1-6.

- Green T.J., Barnes A.C., 2009. Inhibitor of REL/NF- κ B is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible, *Fish & Shellfish Immunology*, 27: 260-265.
- Gueguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumiguere C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*, *Gene*, 303:139-145.
- Hancock R., Rozek A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides, *FEMS Microbiology Letters*, 206: 143-149.
- Helm M.M., Bourne N., Lovatelli A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual, *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 471: 177p.
- Hughes T.K., Smith E.M., Barnett J.A., Charles R., Stefano G.B., 1991. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1, *Developmental and Comparative Immunology*, 15: 117-122.
- Huvet A., Herpin A., Dégremont L., Labreuche Y., Samain J-F., Cunningham C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality, *Gene*, 343: 211-220.
- Janeway C.A., Medzhitov R., 2002. Innate immune recognition, *Annual Review of Immunology*, 20: 197-216.
- Jing X., Pales Espinosa E., Perrigault M., Allam B., 2011. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 851-858.
- Kim J.Y., Adhya M., Cho S.K., Choi K.S., Cho M., 2008. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*), *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 598-603.
- Kiss T., 2010. Apoptosis and its functional significance in mollusks, *Apoptosis*, 15: 313-321.
- Kourtidis A., Drosopoulou E., Nikolaidis N., Hatzi V.I., Chintiroglou C.C., Scouras Z.G., 2006. Identification of Several Cytoplasmic HSP70 Genes from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Their Long-Term Evolution in Mollusca and Metazoa, *Journal of Molecular Evolution*, 62: 446-459.
- Kumar L., Futschik M.E., Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data, *Bioinformatics*, 2 (1): 5-7.
- Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C., Nicolas J-L., 2006a. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 637-379.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S. K., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M., Poulet S.A., 2001a. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France), *Disease of Aquatic Organisms*, 46(2): 139-45.

- Lacoste A., Jalabert F., Malham S.K., Cueff A., Poulet S.A., 2001b. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2304-2309.
- Lane E., Birkbeck H., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes, *Journal of Fish Diseases*, 23: 275-279.
- Lane E., Birkbeck T.H., 1999. Toxicity of bacteria toward hemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Living Resources*, 12: 343-350.
- Lee A., Chae B., Song B., Jung S., Yim H., 2009. QuantiGene 2.0 assay for ER, PR and HER2 RNA levels is a useful adjunctive for the evaluation of ER, PR and HER2 in breast cancer, *Cancer Research*, 69 (S4), 4153.
- Le Roux F., Binesse J., Saulnier D., Mazel D., 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector, *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 777-784.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events, *Aquatic Living Resources*, 15 (4): 251-258.
- Li H., Parisi M-G., Toubiana M., Cammarata M., Roch P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses, *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 143-152.
- Li Q., Verma I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system, *Nature Reviews Immunology*, 2: 725-734.
- Lindquist S., Craig E.A., 1988. The heat-shock proteins, *Annual Reviews of Genetics*, 22: 631-677.
- Luan Y., Li. H., 2003. Clustering of time-course gene expression data using a mixed-effects model with B-splines, *Bioinformatics*, 19(4): 474-482.
- Mateo D.R., Greenwood S.J., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Siah A., 2010. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains, *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 710-714.
- Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Greenwood S.J., 2009. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence, *Journal of Invertebrate Pathology*, 102: 50-56.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P., 2000. Minireview: Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity, *FEBS Letters*, 486: 185-190.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P., 1999. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge, *Journal of Cell Science*, 112: 4233-4242.
- Mizuta S., Miyagi T., Nishimiya T., Yoshinaka R., 2004. Partial characterization of collagen in several bivalve mollusks, *Food chemistry*, 87(1): 83-88.

- Montagnani C., Avarre J., de Lorgeril J., Quinquand M., Boulo V., Escoubas J., 2007. First evidence of the activation of *Cg-timp*, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway, *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 1-11.
- Montagnani C., Kappler C., Reichhart J.M., Escoubas J.M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *FEBS Letters*, 561(1-3): 75-82.
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J-M., 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with potential role in wound healing and defense mechanisms, *FEBS Letters*, 500: 64-70.
- Moreira R., Balseiro P., Planas J.V., Fuste B., Beltran S., Novoa B., Figueras A., 2012. Transcriptomics of *In Vitro* Immune-Stimulated Hemocytes from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Using High-Throughput Sequencing, *PLoS ONE*, 7(4):e35009.
- Mu C., Yu Y., Zhao J., Wang L., Song X., Zhang H., Qiu L., Song L., 2010. An inhibitor kB homologue from bay scallop *Argopecten irradians*, *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 687-694.
- Novas A., Cao A., Barcia R., Ramos-Martinez J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (3): 390-394.
- Ottaviani E., 2006. Molluscan immunorecognition, *Invertebrate Survival Journal*, 3: 50-63.
- Park E-M., Kim Y-O., Nam B-H., Kong H.J., Kim W-J., Lee S-L., Kong I-S., Choi T-J., 2008. Cloning, characterization and expression, analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induce TNF- α factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 11-17.
- Philipp E.E.R., Kraemer L., Melzner F., Poustka A.J., Thieme S., Findeisen U., Schreiber S., Rosenstiel P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*, *PLoS ONE*, 7(3):e33091.
- Piano A., Valbonesi P., Fabri E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals, *Cell Stress & Chaperones*, 9: 134-142.
- Pruzzo C., Gallo G., Canesi L., 2005. Minireview: Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components, *Environmental Microbiology*, 7 (6): 761-772.
- Qiu L., Song L., Xu W., Ni D., Yu Y., 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 451-466.
- Roberts S., Goetz G., White S., Goetz F., 2009. Analysis of genes isolated from plated haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Marine Biotechnology*, 11: 24-44.
- Roberts S., Gueguen Y., de Lorgeril J., Goetz F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure, *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 1099-1104.

- Romero A., Dios S., Poisa-Beiro L., Costa M.M., Posada D., Figueras A., Novoa B., 2011. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates, *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 334-344.
- Rosenstiel P., Jacobs G., Till A., Schreiber S., 2008. NOD-like receptors: Ancient sentinels of the innate immune system, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 1361-1377.
- Sanjuan M.A., Dillon C.P., Tait S.W.G., Moshiach S., Dorsey F., Connell S., Komatsu M., Tanaka K., Cleveland J.L., Withoff S., Green D.R., 2007. Toll like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature*, 450: 1253-1257.
- Schulz M.H., Zerbino D.R., Vingron M., Birney E., 2012. Oases: Robust *de Novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels, *Bioinformatics*, 28 (8): 1086-1092.
- Siah A., McKenna P., Danger J.M., Johnson G., Berthe F.C.J., 2012. Expression of RAS-like family members, c-jun and c-myc mRNA levels in neoplastic hemocytes of soft-shell clams *Mya arenaria* using microsphere-based 8-plex branched DNA assay, *Results in Immunology*, 2: 83-87.
- Sokolova I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense, *Invertebrate Survival Journal*, 6: 49-58.
- Song L., Wu L., Ni D., Chang Y., Xu W., Xing K., 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819), responding to bacteria challenge and naphthalin stress, *Fish & Shellfish Immunology*, 21: 335-345.
- Tanguy M., McKenna P., Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Danger J.M., Siah A., *in press*. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*, *Developmental and Comparative Immunology*.
- Tanguy M., McKenna P., Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Danger J.M., Siah A., submitted in *Results in Immunology*. Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain.
- Tasumi S., Vasta G.R., 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*, *Journal of Immunology*, 179(5): 3086-3098.
- Terahara K., Takahashi K.G., Nakamura A., Osada M., Yoda M., Hiroi T., Hirasawa M., Mori K., 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental and Comparative Immunology*, 30(8): 667-83.
- Tincu J., Taylor S., 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3645-3654.
- Travers M-A., Le Bouffant R., Friedman C.S., Buzin F., Cougard B., Huchette S., Koken M., Paillard C., 2009. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response, *Journal of Cellular Biochemistry*, 106: 152-160.

- Vallabhapurapu S., Karin M., 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system, *Annual Review of Immunology*, 27: 693-733.
- Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante F., Lanfranchi G., Novoa B., Roch P., Figueras A., Pallavicini A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, *BMC Genomics*, 12: 69.
- Venier P., De Pittà C., Bernante F., Varotto L., De Nardi B., Bovo G., Roch P., Novoa B., Figueras A., Pallavicini A., Lanfranchi G., 2009. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences, *BMC genomics*, 10: 72.
- Vicente-Manzanares M., Sanchez-Madrid F., 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses, *Nature Reviews Immunology*, 4(2): 110-122.
- Wallin R.P.A., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H-G., 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system, *TRENDS in Immunology*, 23 (3): 130-135.
- Wang L., Song L., Zhao J., Qiu L., Zhang H., Xu W., Li H., Li C., Wu L., Guo X., 2009. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Discovery and annotation of host-defense genes, *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 744-750.
- Yamamoto M., Takeda K., Akira S., 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling, *Molecular Immunology*, 40: 861-868.
- Yang F.C., Tan B.C., Chen W.H., Lin Y.H., Huang J.Y., Chang H.Y., Sun H.Y., Hsu P.H., Liou G.G., Shen J., Chang C.J., Han C.C., Tsai M.D., Lee S.C., *in press*. Reversible acetylation regulates salt-inducible kinase (SIK2) and its Function in autophagy, *the Journal of Biological Chemistry*.
- Yang J., Wang L., Zhang H., Qiu L., Wang H., Song L., 2011. C-Type Lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) Mediating Immune Recognition and Opsonization, *PLoS ONE*, 6 (2): e17089.
- You Y., Huan P., Wang X., Liu B., 2012. The potential roles of a laminin receptor in adhesion and apoptosis of cells of the marine bivalve *Meretrix meretrix*, *PLoS One*, 7(10):e47104.
- Yu Y., Qiu L., Song L., Zhao J., Ni D., Zhang Y., Xu. 2007. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 419-429.
- Yu Z., He X., Fu D., Zhang Y., 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*, *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 533-539.
- Zhang L., Li L., Zhang G., 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates, *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 653-660.
- Zhang H., Song L., Li C., Zhao J., Wang H., Qiu L., Ni D., Zhang Y., 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity, *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 281-289.

Figures

Figure 1: length distribution of all assembled reads generated.

Figure 2: Toll-like Receptor signaling KEGG pathway members: Shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 3: NOD-like receptor signaling KEGG pathway members: Shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 4: NF-kappa B signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 5: MAPK signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 6: JAK-STAT signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 7: Phagosome KEGG members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 8: Lysosome KEGG members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 9: Regulation of actin cytoskeleton KEGG members: shaded indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

Figure 10: Apoptosis KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled results and white boxes the absent ones.

Figure 11: Kinetics of transcript levels of the 10 clusters. Expression change was expressed as z-score.

Figure 12A: Normalized transcript levels of 10 targets transcripts selected as “candidates” in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified by the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 6$.

Figure 12B: Normalized transcript levels of 10 targets transcripts selected as “candidates” in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* 7SHRW strain (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified by the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 6$.

Tables

Table 1: Target-specific probes of the 10 “candidate” transcripts identified from each cluster and of the 3 transcripts identified as no-regulated. BL : Blockers; CE : Capture Extenders; LE : Label Extenders. Due to the short length of sequence referred as No-regulated 1, the blocker (BL) was not designed.

Table 2: List of KEGG Orthology (KO) assignments obtained by BLAST comparison against the KEGG GENES database. Nb KO corresponds to the number of KO associated with the corresponding pathways (entries with a KO lower than 5 are not listed).

Table 3: Distribution in each cluster of *M. edulis* sequences of the Gene Ontology term belonging to “Biological Process”. Frequencies of occurrence of each term in a particular cluster are indicated in %.

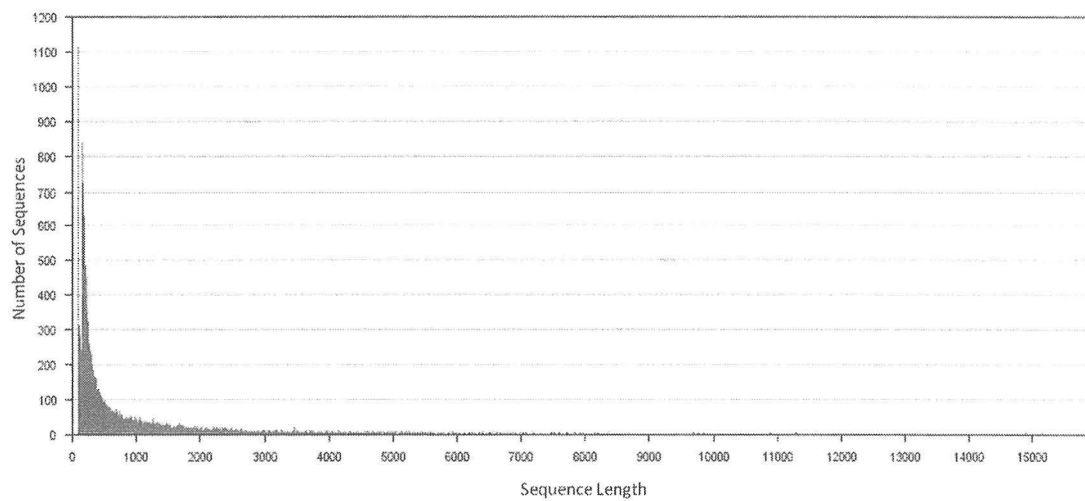


Figure 1: length distribution of all assembled reads generated.

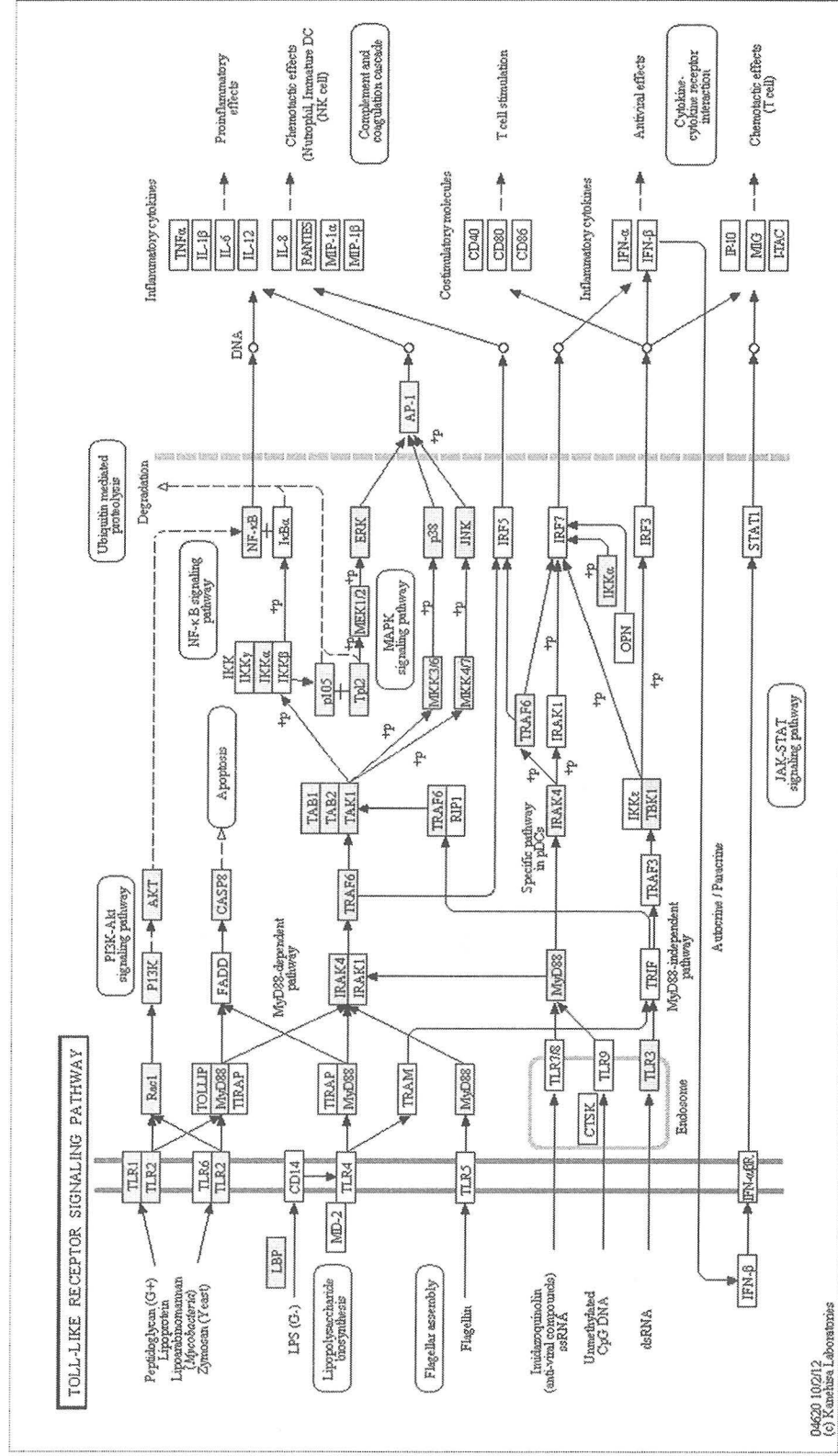


Figure 2: Toll-like Receptor signaling KEGG pathway members: Shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

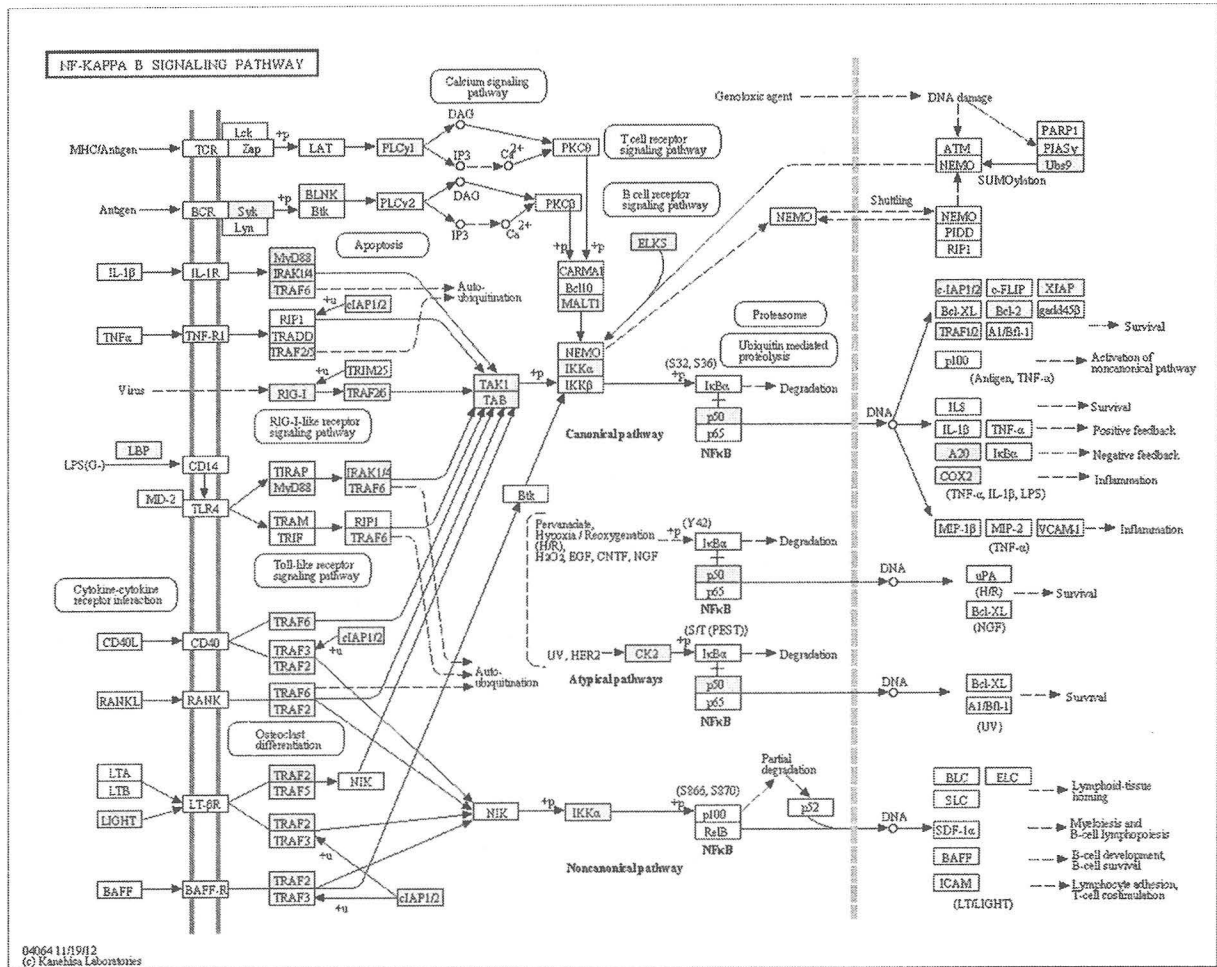


Figure 4: NF-kappa B signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

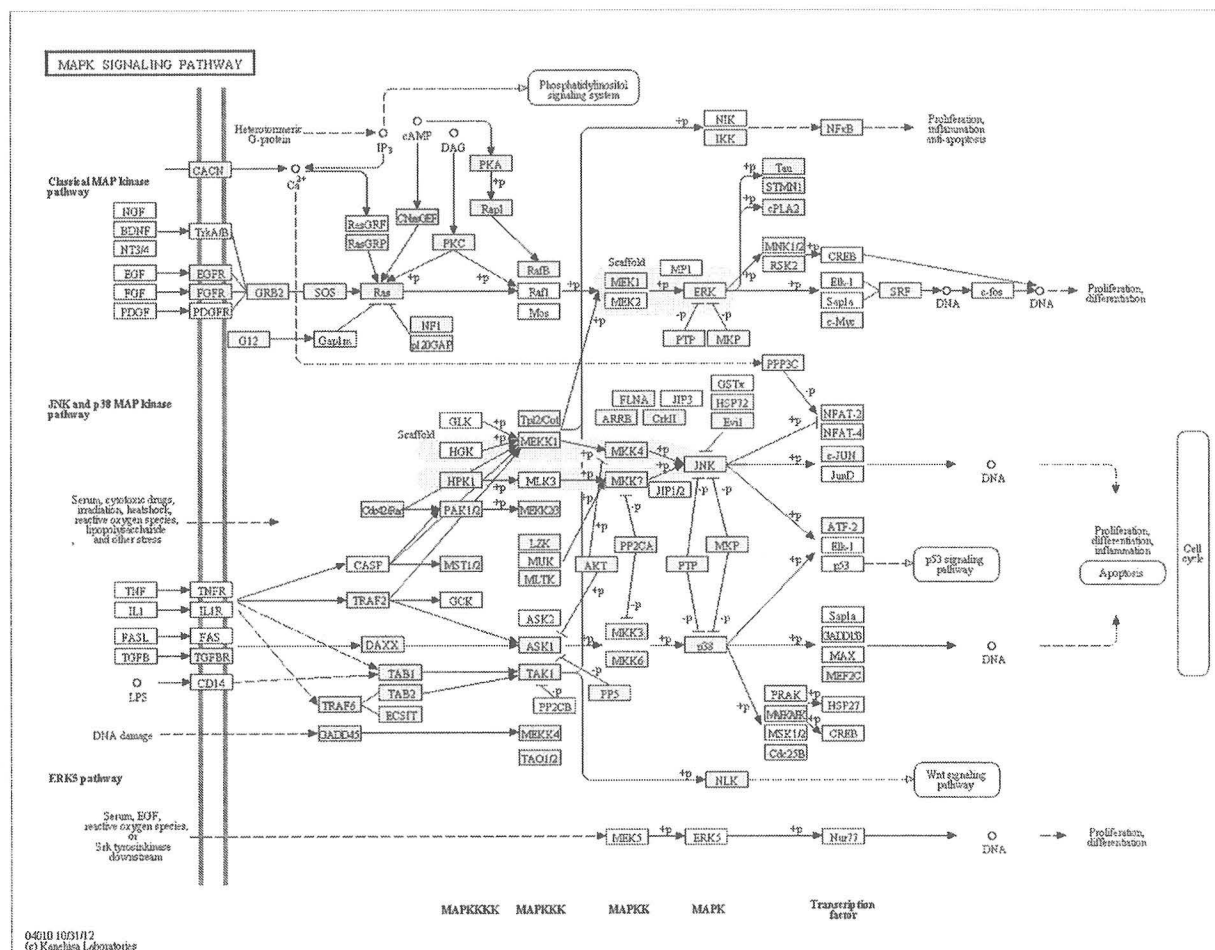


Figure 5: MAPK signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

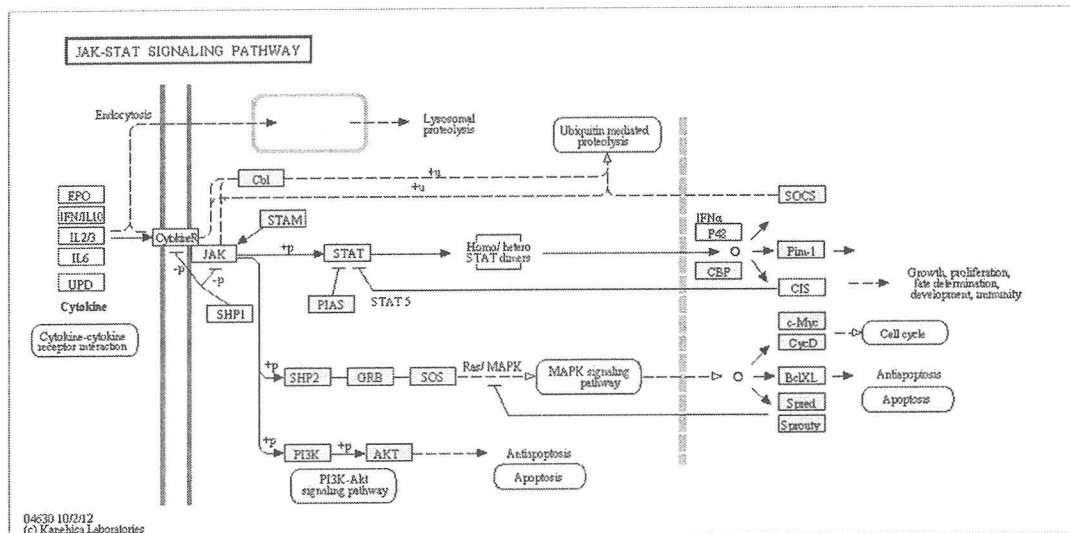


Figure 6: JAK-STAT signaling KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

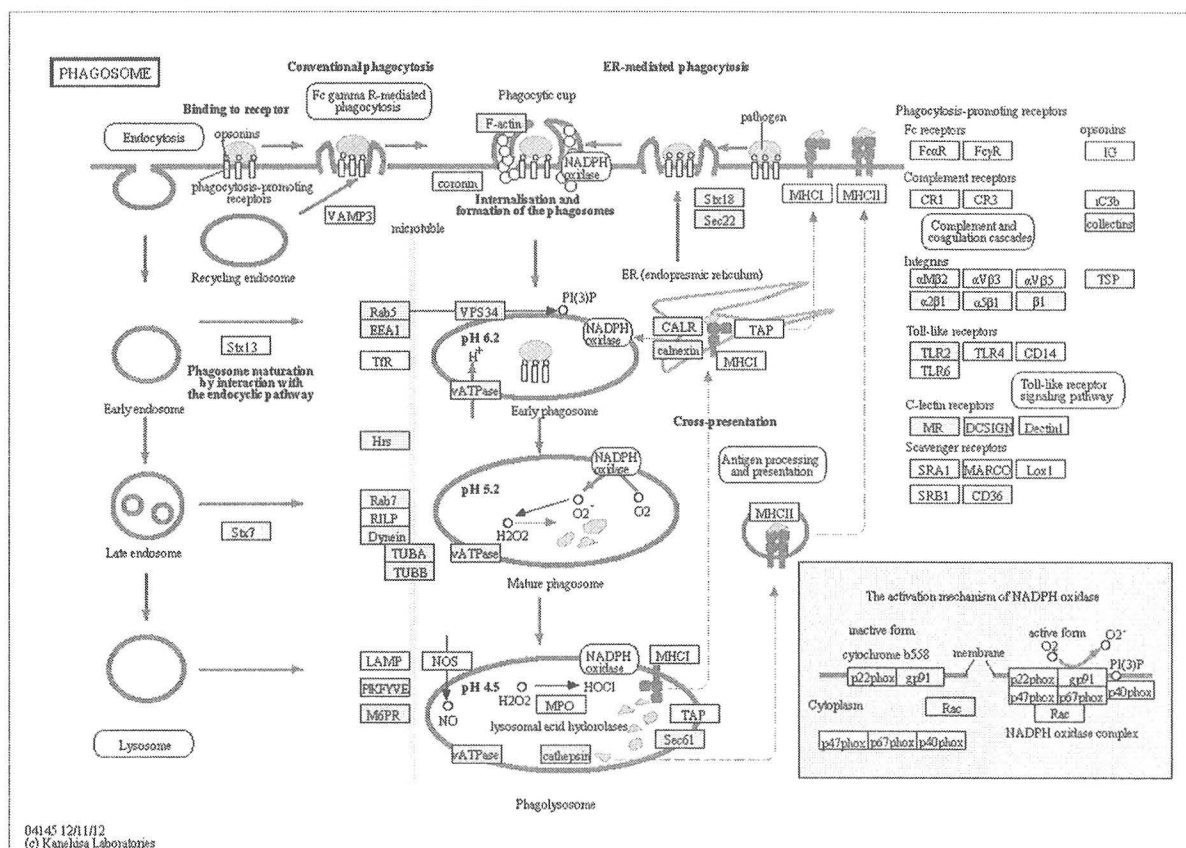


Figure 7: Phagosome KEGG members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

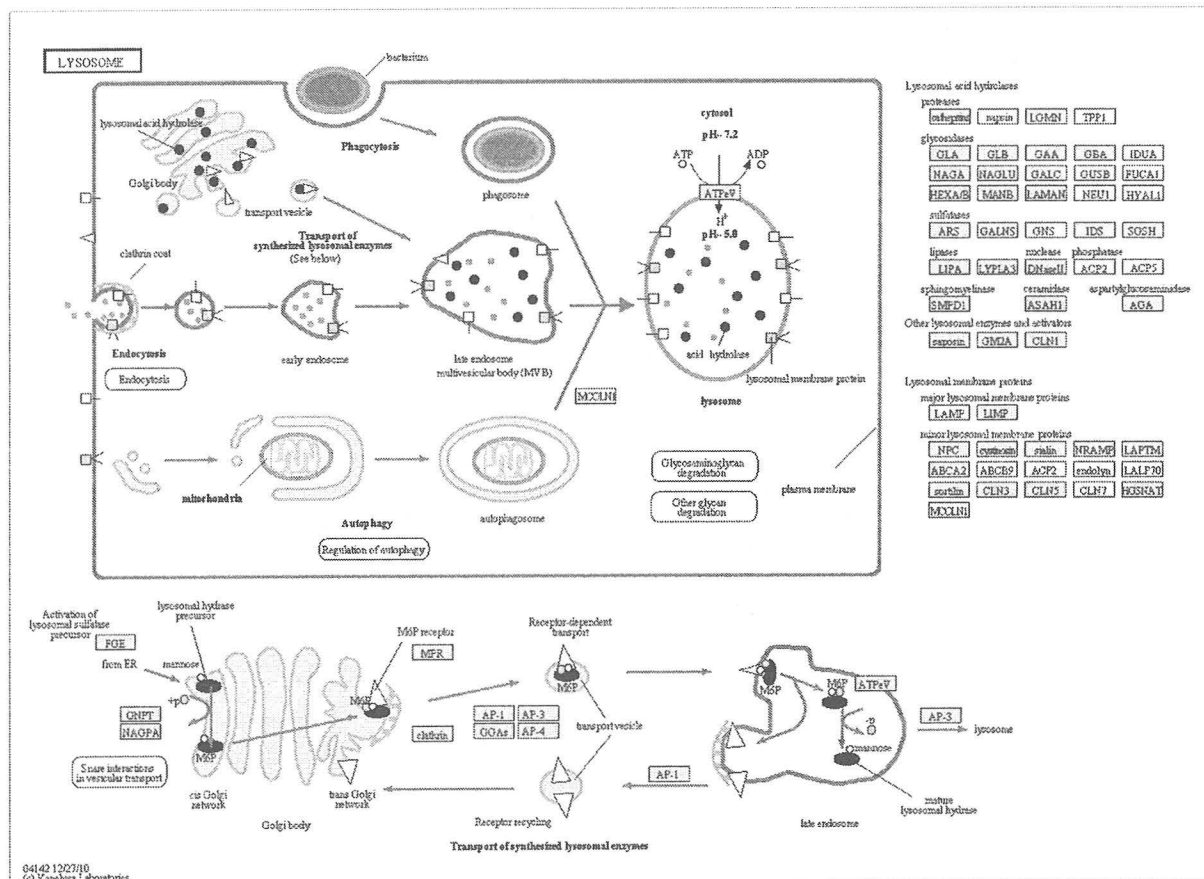


Figure 8: Lysosome KEGG members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

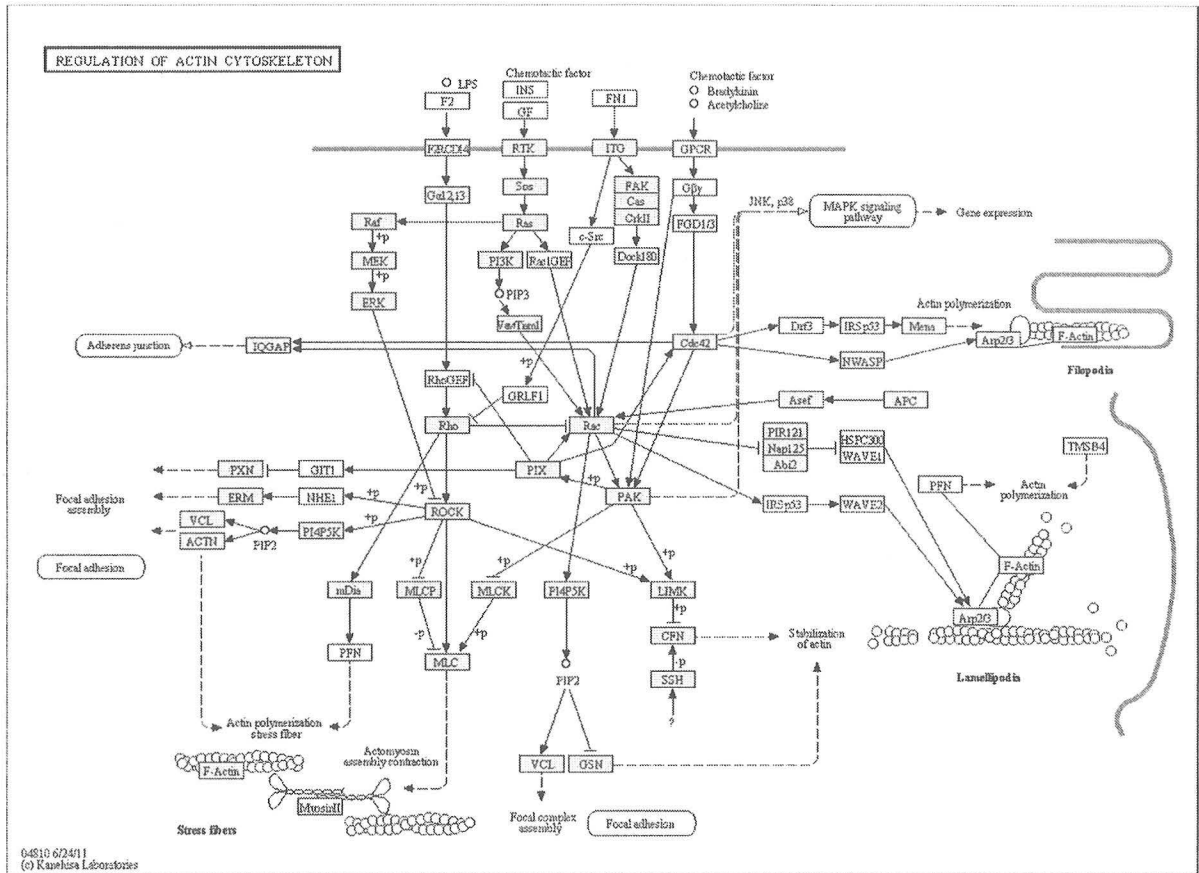


Figure 9: Regulation of actin cytoskeleton KEGG members: shaded indicate proteins identified in our assembled sequences and white boxes the absent ones.

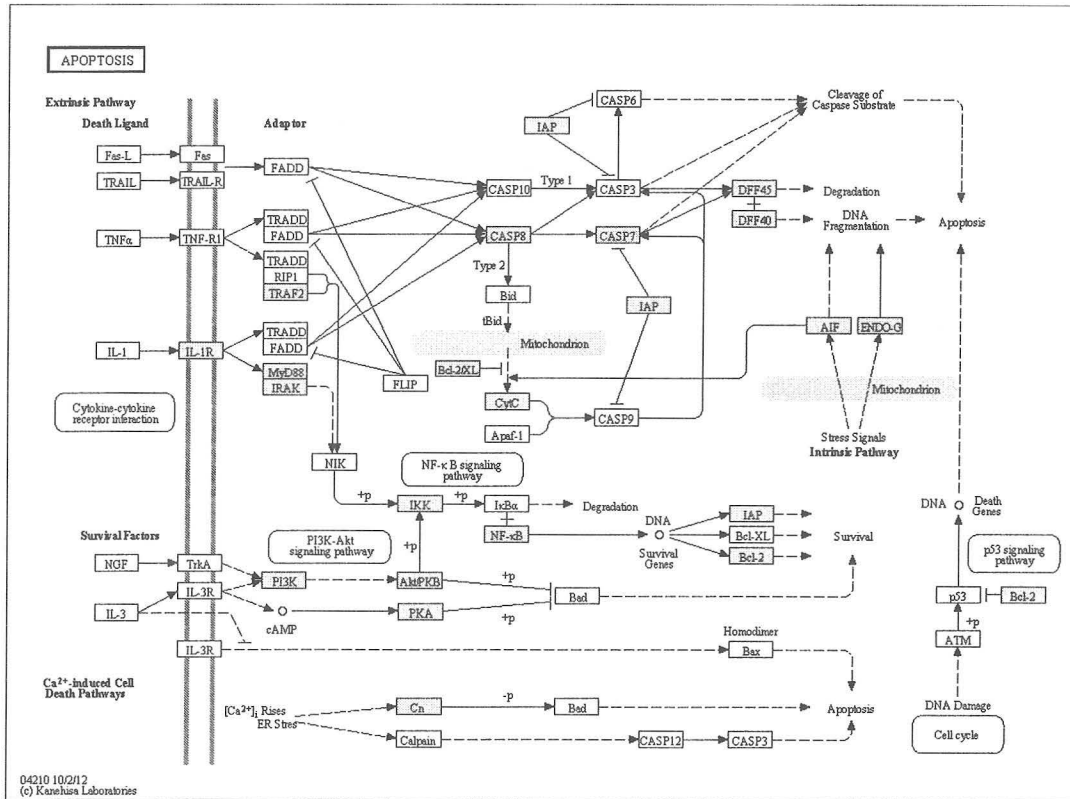


Figure 10: Apoptosis KEGG pathway members: shaded boxes indicate proteins identified in our assembled results and white boxes the absent ones.

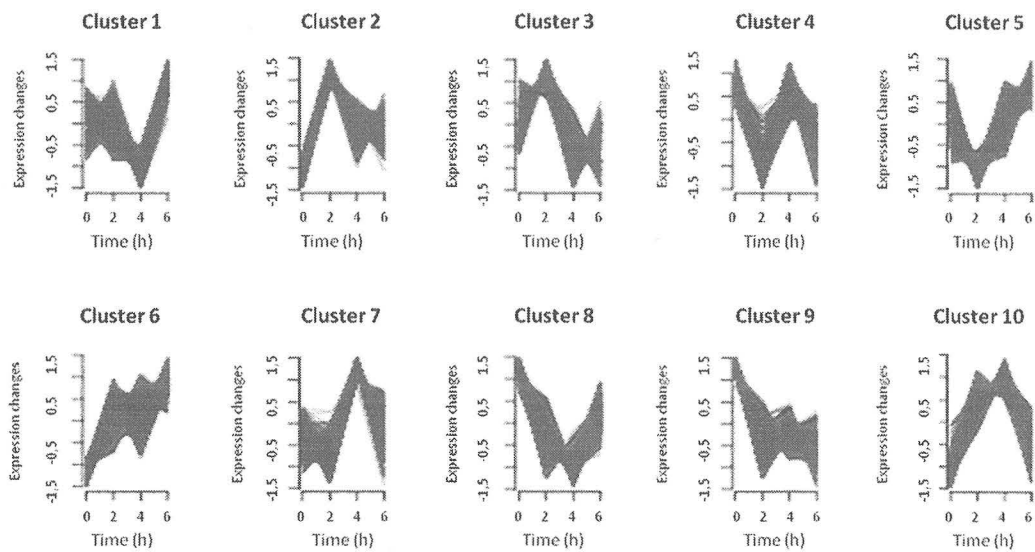


Figure 11: Kinetics of transcript levels of the 10 clusters. Expression change was expressed as z-score.

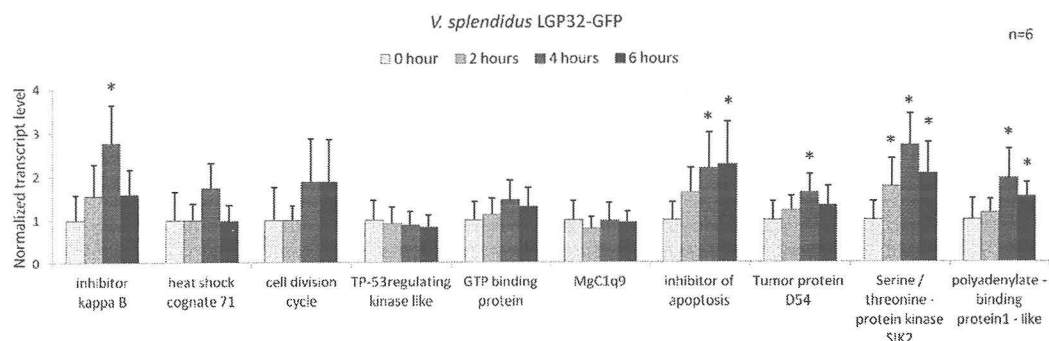


Figure 12A: Normalized transcript levels of 10 targets transcripts selected as “candidates” in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* LGP32-GFP strain (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified by the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 6$.

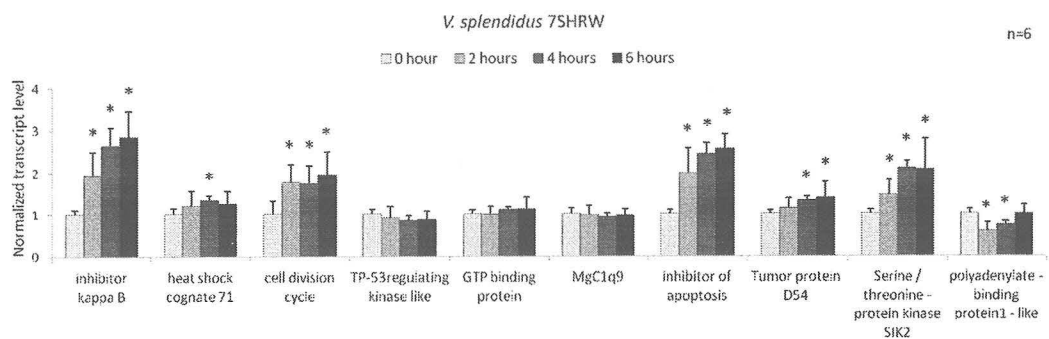


Figure 12B: Normalized transcript levels of 10 targets transcripts selected as “candidates” in hemocytes exposed for 2, 4, and 6 h to the virulent *V. splendidus* 7SHRW strain (mean \pm standard deviation). The mRNA level was quantified by the QuantiGene Plex 2.0 assay. The controls (0 h) represent hemocytes incubated without bacteria. Stars (*) correspond to the statistical difference ($p < 0.05$) between control (0 h) and infected (t-test), $n = 6$.

Table 1:

Target-specific probes of the 10 “candidate” transcripts identified from each cluster and of the 3 transcripts identified as no-regulated.

BL : Blockers; CE : Capture Extenders; LE : Label Extenders. Due to the short length of sequence referred as No-regulated 1, the blocker (BL) was not designed.

[illegible]

Table 2:

List of KEGG Orthology (KO) assignments obtained by BLAST comparison against the KEGG GENES database. Nb KO corresponds to the number of KO associated with the corresponding pathways (entries with a KO lower than 5 are not listed).

Metabolism			
Reference pathway	Nb KO	Reference pathway	Nb KO
Carbohydrate metabolism			
00010 Glycolysis / Gluconeogenesis	30	00190 Oxidative phosphorylation	73
00020 Citrate cycle (TCA cycle)	24	00195 Photosynthesis	7
00030 Pentose phosphate pathway	19	00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms	13
00040 Pentose and glucuronate interconversions	12	00730 Carbon fixation pathways in prokaryotes	9
00051 Fructose and mannose metabolism	18	00680 Methane metabolism	23
00052 Galactose metabolism	19	00610 Nitrogen metabolism	11
00053 Ascorbate and aldarate metabolism	7	00620 Sulfur metabolism	9
00060 Starch and sucrose metabolism	21	00630 Nucleotide metabolism	18
00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	29	00130 Purine metabolism	6
00620 Pyrimidine metabolism	29	00240 Pyrimidine metabolism	11
00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	19	00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	77
00640 Propanoate metabolism	23	00260 Glycine, serine and threonine metabolism	7
00650 Branched amino acid metabolism	22	00270 Cysteine and methionine metabolism	12
00662 Inositol phosphate metabolism	27	00380 Valine, leucine and isoleucine degradation	9
Lipid metabolism			
00061 Fatty acid biosynthesis	6	00300 Lysine biosynthesis	13
00062 Fatty acid elongation	19	00310 Lysine degradation	12
00071 Fatty acid metabolism	26	00330 Arginine and proline metabolism	18
00100 Steroid biosynthesis	12	00340 Histidine metabolism	8
00120 Primary bile acid biosynthesis	8	00350 Tyrosine metabolism	20
00140 Steroid hormone biosynthesis	10	00360 Phenylalanine metabolism	9
00561 Glycerolipid metabolism	25	00380 Tryptophan metabolism	9
00564 Glycerophospholipid metabolism	40	00410 Metabolism of other amino acids	11
00565 Ether lipid metabolism	11	00430 beta-Alanine metabolism	9
00603 Sphingolipid metabolism	23	00435 Thiamine and hypoxanthine metabolism	11
00590 Arachidonic acid metabolism	15	00450 Selenocompound metabolism	9
00591 Linoleic acid metabolism	8	00480 Glutathione metabolism	19
00592 alpha-Linolenic acid metabolism	9		
01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	12		
General information and processing			
Reference pathway	Nb KO	Reference pathway	Nb KO
Transcription			
03020 RNA polymerase	29	03015 mRNA surveillance pathway	53
03022 Basal transcription factors	31	03008 Ribosome biogenesis in eukaryotes	50
03040 Spliceosome	95	03010 Folding, sorting and degradation	31
Translation			
03010 Ribosome	88	03060 Protein export	28
00670 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	27	04141 Protein processing in endoplasmic reticulum	35
03013 RNA transport	111	04130 SNARE interactions in vesicular transport	17
		04120 Ubiquitin mediated proteolysis	16
		03050 Proteasome	23
Reference pathway			
Glycan biosynthesis and metabolism		05018 RNA degradation	
N-Glycan biosynthesis		05019 Replication and repair	
Various types of N-glycan biosynthesis		05020 DNA replication	
Other types of O-glycan biosynthesis		05040 Base excision repair	
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate /		05041 Nucleotide excision repair	
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate /		05042 Mismatch repair	
Glycosaminoglycan degradation		05043 Homologous recombination	
Glycosaminoglycan biosynthesis (GPI-anchor biosynthesis)		05044 Fucosyl manna pathway	
Glycosylated biosynthesis - glucose series			
Glycosylated biosynthesis - glucose series			
Other glycan degradation			
Metabolism of cofactors and vitamins			
Ethanolamine metabolism			
Vitamin B6 metabolism			
Nicotinate and nicotinamide metabolism			
Pantoic acid and CoA biosynthesis			
Folate biosynthesis			
One carbon pool by folate			
Ramose metabolism			
Pyrophosphate and chlorophyll metabolism			
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis			
Metabolism of terpenoids and polyketides			
Terpenoid backbone biosynthesis			
Xenobiotics biodegradation and metabolism			
Benzene degradation			
Amino acid metabolism			
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450			
Drug metabolism - cytochrome P450			
Drug metabolism - other enzymes			

(Table 2- Next)

Environmental Information Processing			
Reference pathway	Nb KO	Reference pathway	Nb KO
Membrane transport			
02010 ABC transporters	15	04330 Notch signaling pathway	18
Signal transduction			
02020 Two-component system	12	04340 Hedgehog signaling pathway	9
04010 MAPK signaling pathway	75	04350 TGF-beta signaling pathway	24
04013 MAPK signaling pathway - fly	10	04391 Hippo signaling pathway - fly	30
04011 MAPK signaling pathway - yeast	9	04370 VEGF signaling pathway	21
04012 ErbB signaling pathway	31	04630 Jak-STAT signaling pathway	20
04310 Wnt signaling pathway	51	04064 NF-kappa B signaling pathway	26
		04066 HIF-1 signaling pathway	35
		04020 Calcium signaling pathway	34
Cellular Processes			
Reference pathway	Nb KO	Reference pathway	Nb KO
Transport and catabolism			
04144 Endocytosis	82	04110 Cell growth and death	67
04145 Phagosome	45	04111 Cell cycle - yeast	50
04142 Lysosome	71	04113 Meiosis - yeast	39
04146 Peroxisome	54	04114 Oocyte matosis	40
04140 Regulation of autophagy	12	04210 Apoptosis	24
		04115 p53 signaling pathway	20
Organismal Systems			
Reference pathway	Nb KO	Reference pathway	Nb KO
Immune system			
04630 Toll-like receptor signaling pathway	29	04260 Circulatory system	18
04621 NOD-like receptor signaling pathway	16	04260 Cardiac muscle contraction	26
04622 RIG-I-like receptor signaling pathway	19	04270 Vascular smooth muscle contraction	26
04623 Cytosolic DNA-sensing pathway	23	Digestive system	
04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity	21	04970 Salivary secretion	18
04612 Antigen processing and presentation	15	04971 Gastric acid secretion	16
04603 T cell receptor signaling pathway	30	04972 Pancreatic secretion	27
04602 B cell receptor signaling pathway	25	04973 Bile secretion	16
04604 Fc epsilon RI signaling pathway	20	04973 Carbohydrate digestion and absorption	9
04606 Fc gamma R-mediated phagocytosis	33	04974 Protein digestion and absorption	20
04670 Leukocyte transendothelial migration	29	04975 Fat digestion and absorption	20
04067 Chemokine signaling pathway	38	04977 Vitamin digestion and absorption	19
Endocrine system			
04910 Insulin signaling pathway	55	04978 Mineral absorption	9
04920 Adipocytokine signaling pathway	23	Excretory system	
04920 FGF signaling pathway	21	04982 Vasopressin-regulated water reabsorption	14
04912 GnRH signaling pathway	29	04980 Aldosterone-regulated sodium reabsorption	28
04914 Progesterone-mediated oocyte maturation	36	04981 reabsorption	35
04916 Melanogenesis	25	04981 Proximal tubule bicarbonate reclamation	11
		04986 Collecting duct acid secretion	21
			04036 Plant-pathogen interaction

Table 3: Distribution in each cluster of *M. edulis* sequences of the Gene Ontology term belonging to "Biological Process". Frequencies of occurrence of each term in a particular cluster are indicated in %.

Cluster 1			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
transcription	65.52	65.52	0.86
translational elongation	15.52	translational elongation	0.86
response to stress	3.45	transmembrane transport	0.43
one-carbon metabolic process	3.45	protein catabolic process	0.43
protein folding	3.02	translational initiation	0.43
transport	1.29	positive regulation of transcription, DNA-dependent	0.43
ribosome biogenesis	1.29	nucleoside diphosphate phosphorylation	0.43
		GTP biosynthetic process	0.43
Cluster 2			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
transcription	24.55	24.55	0.91
translational elongation	16.82	translational elongation	0.91
GTP catalytic process	12.73	translational elongation	0.91
response to stress	7.73	translational elongation	0.91
protein folding	4.09	translational elongation	0.91
protein phosphorylation	2.27	translational elongation	0.91
amylase-promoting cytoskeletal protein assembly	2.27	translational elongation	0.91
dependent protein catabolic process	1.32	translational elongation	0.91
transport	1.32	translational elongation	0.91
oxidation-reduction process	1.32	translational elongation	0.91
protein transport	1.32	translational elongation	0.91
protein polymerization	1.32	translational elongation	0.91
regulation of transcription, DNA-dependent	0.91	translational elongation	0.91
signal transduction	0.91	translational elongation	0.91
proteolysis	0.91	translational elongation	0.91
vent reproduction	0.91	translational elongation	0.91
ribosome biogenesis	0.91	translational elongation	0.91
Cluster 3			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
G-protein-coupled receptor signaling pathway	7.51	7.51	1.16
translocation	6.94	translocation	1.16
proteolysis	6.56	translocation	1.16
response to stress	4.05	translocation	1.16
protein phosphorylation	4.05	translocation	1.16
transport	3.47	translocation	1.16
cell adhesion	2.89	translocation	1.16
amylase-promoting cytoskeletal protein assembly	2.89	translocation	1.16
dependent protein catabolic process	2.89	translocation	1.16
oxidation-reduction process	2.31	translocation	1.16
translational elongation	2.31	translocation	1.16
small GTPase mediated signal transduction	2.31	translocation	1.16
Nucleoside diphosphate catabolic process	2.31	translocation	1.16
magnesium-mediated signaling pathway	2.31	translocation	1.16
metabolic process	1.73	translocation	1.16
protein folding	1.73	translocation	1.16

Cluster 3 (New)		
Description	Frequency (%)	Frequency (%)
dephosphorylation	1.73	0.58
glucosylase	1.73	0.58
peptidyl-L-proline dephosphorylation	1.73	0.58
translational transfection	1.73	0.58
positive regulation of translational elongation	1.73	0.58
transcription, DNA-dependent	1.16	0.58
iron, reproduction	1.16	0.58
mitochondrial organum development	1.16	0.58
apoptotic process	1.16	0.58
translational inhibition	1.16	0.58
steroid hormone mediated signaling pathway	1.16	0.58
defense response to bacterium	1.16	0.58
transcription	18.44	0.56
proteolysis	12.28	0.56
oxidation-reduction process	8.58	0.56
protein phosphorylation	7.82	0.56
translational elongation	6.70	0.56
carbohydrate metabolic process	3.91	0.56
GTP catalytic process	3.91	0.56
transport	3.35	0.56
response to stress	2.79	0.56
peptide cross-linking	2.23	0.56
metabolic process	2.23	0.56
protein folding	2.23	0.56
regulation of transcription, DNA-dependent	2.23	0.56
ribosome biogenesis	2.23	0.56
transcription	48.13	0.43
oxidation-reduction process	9.13	0.43
translational elongation	6.52	0.43
protein folding	3.91	0.43
protein phosphorylation	3.48	0.43
response to stress	3.48	0.43
respiratory electron transport chain	3.04	0.43
aerobic electron transport chain	2.61	0.43
GTP catalytic process	2.17	0.43
regulation of transcription, DNA-dependent	2.17	0.43
transport	2.17	0.43
transcription	22.40	0.80
oxidation-reduction process	8.80	0.80
cellular iron ion homeostasis	7.20	0.80
GTP catalytic process	7.20	0.80
translational inhibition	7.20	0.80
transcription	18.44	0.56
proteolysis	12.28	0.56
oxidation-reduction process	8.58	0.56
protein phosphorylation	7.82	0.56
translational elongation	6.70	0.56
carbohydrate metabolic process	3.91	0.56
GTP catalytic process	3.91	0.56
transport	3.35	0.56
response to stress	2.79	0.56
peptide cross-linking	2.23	0.56
metabolic process	2.23	0.56
protein folding	2.23	0.56
regulation of transcription, DNA-dependent	2.23	0.56
ribosome biogenesis	2.23	0.56
transcription	48.13	0.43
oxidation-reduction process	9.13	0.43
translational elongation	6.52	0.43
protein folding	3.91	0.43
protein phosphorylation	3.48	0.43
response to stress	3.48	0.43
respiratory electron transport chain	3.04	0.43
aerobic electron transport chain	2.61	0.43
GTP catalytic process	2.17	0.43
regulation of transcription, DNA-dependent	2.17	0.43
transport	2.17	0.43
transcription	22.40	0.80
oxidation-reduction process	8.80	0.80
cellular iron ion homeostasis	7.20	0.80
GTP catalytic process	7.20	0.80
translational inhibition	7.20	0.80

(Table 3- Next2)

Cluster 6 (Next)			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
protein polymerization	7.26	ATP catabolic process	1.60
ATP synthesis coupled electron transport	4.80	ATP synthesis coupled proton transport	1.60
microtubule-based process	4.80	protein phosphorylation	0.80
transport	4.80	transmembrane transport	0.80
electron transport chain	4.00	transgenesis	0.80
translational elongation	4.00	cell adhesion	0.80
Cluster 7			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
oxidation-reduction process	27.63	protein folding	1.32
metabolic process	7.89	neurotrophin-mediated signaling pathway	1.32
transport	7.89	translational elongation	1.32
regulation of transcription, DNA-dependent	6.58	42NA mutagenesis	1.32
protein phosphorylation	5.26	viral genome replication	1.32
transcription	5.26	aerobic electron transport chain	1.32
glucanogenesis	3.95	arginine metabolic process	1.32
ATP synthesis coupled electron transport	2.63	biosynthetic process	1.32
clathrin or flagellar motility	2.63	DNA replication	1.32
Cluster 8			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
transcription	43.13	electron transport chain	0.63
translational elongation	16.25	protein polymerization	0.63
GTP catabolic process	8.75	ATP synthase coupled electron transport	0.63
oxidation-reduction process	5.63	azotobacter-based process	0.63
response to stress	5.63	nucleoside diphosphate phosphorylation	0.63
transport	4.38	transmembrane transport	0.63
protein folding	3.75	actin filament-based movement	0.63
Cluster 9			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
oxidation-reduction process	20.97	translational initiation	1.61
C-protein coupled receptor signaling pathway	14.52	amino sugar metabolic process	1.61
transport	9.68	cell-cell signaling	1.61
metabolic process	8.06	chromosome organization	1.61
protein phosphorylation	4.84	GPI anchor biosynthetic process	1.61
regulation of transcription, DNA-dependent	4.84	heme biosynthetic process	1.61
ATP catabolic process	3.25	lipid metabolic process	1.61
ATP synthesis coupled electron transport	3.25	tricarboxylic acid cycle	1.61
nucleoside transport	3.25	neurotransmitter transport	1.61
Cluster 10			
Description	Frequency (%)	Description	Frequency (%)
oxidation-reduction process	18.37	G-protein coupled receptor signaling pathway	2.04
transcription	18.37	GTP biosynthetic process	2.04
ATP synthesis coupled electron transport	8.16	intracellular protein transport	2.04
proteolysis	8.16	ion transport	2.04
transport	8.16	metabolic process	2.04
electron transport chain	4.08	mitosis	2.04
aerobic electron transport chain	2.04	mitotic cell cycle	2.04
GTP nuclear biosynthetic process	2.04	nucleoside diphosphate phosphorylation	2.04

Chapitre V

Discussion générale et Conclusion

Lors des précédents chapitres, le transcriptome hémocytaire adulte de *M. edulis* a été déterminé. Les réponses morphologiques, fonctionnelles et moléculaires des hémocytes de la moule bleue en réponse à *V. splendidus* ont été étudiées. Ce présent chapitre est une discussion des principaux résultats obtenus au cours de ce travail, suivi d'une conclusion ouvrant un certain nombre de perspectives à ce travail.

V.1 Synthèse du cheminement et des résultats

Les moules marines *Mytilus edulis* et leurs proches espèces *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. californianus*, *M. chilensis* et *M. coruscus* sont des bivalves très étudiés. Elles sont distribuées à travers le monde et ont un rôle important en écologie des côtes, notamment dans les programmes de biosurveillance comme espèce sentinelle. Elles participent également à l'économie des côtes du fait de leur consommation et de l'activité aquacole développée chez ces espèces (Wade *et al.*, 1998; Auffret *et al.*, 2006; Akaishi *et al.*, 2007 ; Pellerin *et al.*, 2009; Gagné *et al.*, 2009). Sur l'île du Prince Edouard, *Mytilus edulis* est l'espèce aquacole la plus importante. L'industrie de la mytiliculture de l'île fournit 80% des moules bleues sur le marché nord-américain. La pérennité de cette industrie est donc cruciale pour le secteur économique des Îles et des régions côtières.

La diversification des genres et la large distribution écologique ont fait de ces espèces des modèles attractifs pour rechercher les adaptations physiologiques et moléculaires à différentes conditions environnementales (Philipp *et al.*, 2012). Plus particulièrement, la compréhension du système immunitaire a été le centre d'intérêt des recherches chez ces espèces du genre *Mytilus*, afin d'améliorer les conditions d'aquaculture mais aussi de comprendre les processus d'acclimatation et d'adaptation localement et par rapport à des changements environnementaux (Costa *et al.*, 2009b ; Romero *et al.*, 2011). Le système immunitaire des moules a été principalement étudié aux niveaux cellulaire et protéique (Canesi *et al.*, 2002; Canesi *et al.*, 200;), mais de récents travaux au niveau moléculaire donnent déjà des indications sur la complexité et la diversification du système de l'immunité innée (Pallavicini *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009b ; Gestal *et al.*, 2010; Gerdol *et al.*, 2011; Venier *et al.*, 2011; Philipp *et al.*, 2012). Une opportunité de rechercher et d'expliquer les principes physiologiques fondamentaux qui régulent les mécanismes de défenses chez les mollusques est de comprendre comment leurs systèmes biologiques répondent à des expositions microbiennes (Bettencourt *et al.*, 2009).

Les bivalves, tels que les espèces de *Mytilus*, en raison de leur mode d'alimentation de filtreur microphage sont constamment exposés à des flores complexes provenant du milieu environnant.

Ils sont donc sujets à des attaques importantes de pathogènes potentiels. En effet, durant la dernière décennie, les observations de pathogènes pour les bivalves et les mortalités associées ont beaucoup augmenté (Cheney *et al.*, 2000; Huvet *et al.*, 2004; Gestal *et al.*, 2008). Parmi les bactéries opportunistes, les Gram-négatives du genre *Vibrio* sont les bactéries les plus fréquemment isolées à partir des mollusques. Plusieurs espèces appartenant à ce genre ont été liées avec des mortalités et des maladies chez les larves et les juvéniles de différents bivalves (Lacoste *et al.*, 2001a, b; Le Roux *et al.*, 2002 ; Gay *et al.*, 2004a; Gómez-León *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2007). Cependant, chez les moules, les événements de mortalité causés par des agents infectieux et des parasites se produisent moins fréquemment que chez les autres espèces de bivalves telles que les huîtres (Costa *et al.*, 2009a; Venier *et al.*, 2011). Cette constatation peut indiquer que les moules possèdent un système immunitaire relativement efficace pour lutter contre les microorganismes. *Mytilus edulis* a donc été choisi pour cette étude.

Ainsi, ce travail de thèse avait pour objectifs de déterminer de façon la plus complète possible le transcriptome hématocytaire adulte et d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la réponse hématocytaire chez la moule bleue *M. edulis* exposée à la souche bactérienne pathogène *V. splendidus* LGP32 et de les relier à des changements physiologiques. Cela constitue une des étapes de la compréhension des mécanismes du fonctionnement du système immunitaire.

Pour répondre à ces objectifs, un modèle d'infection *in vitro* a été mis en place en exposant des cultures d'hématocytes aux bactéries.

Dans une première partie, **le transcriptome des hématocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* a été identifié.** Pour cela, une banque d'ADNc normalisée construite à partir des hématocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne a été pyroséquencée et analysée (Chapitre II). Des séquences relatives à des FREPs (*Fibrinogen-related protein*), des récepteurs Toll, une PGRP (*Peptidoglycan recognition proteins*), des C1q, des lysozymes, des peptides antimicrobiens, des HSPs (*Heat shock proteins*)..., et en lien avec le phagosome ou l'apoptose ont été identifiées (Chapitre II).

Dans une seconde partie de ce travail, un modèle *in vitro* d'interactions hémocytes-bactéries a été développé en exposant les hémocytes de *M. edulis* à 3 souches de *V. splendidus* afin d'**étudier la cinétique des réponses immunitaires morphologiques et fonctionnelles au cours de l'infection bactérienne**. Les modifications phénotypiques (non-adhérence des cellules) et fonctionnelles (capacité de phagocytose et activation du stress oxydant) ont été suivies par microscopie et cytométrie en flux. Ces approches technologiques ont permis de relier les changements d'expression de gène, préalablement identifié dans la banque d'ADNc, aux modifications phénotypiques que subissent séquentiellement les hémocytes (Chapitre III). Nos résultats ont montré que les deux souches de *V. splendidus* LGP32 ont un effet significatif sur l'adhésion des hémocytes, les capacités de phagocytose et le stress oxydant, dès 2 heures d'exposition, alors que la souche environnementale 7SHRW induit des réponses faibles et retardées. Au niveau moléculaire, nous avons observé une sous-régulation de la défensine chez les hémocytes exposés à *V. splendidus* LGP32. Aussi, une sur-régulation à 2 heures suivie par une sous-régulation à 4 et 6 heures d'exposition à la souche LGP32 ont été observées pour les gènes codant pour le lysozyme et le protéasome 26S. De la même façon, les gènes SOD et GPx sont sur-régulés à 2 heures post-exposition à la souche LGP32 et leurs expressions sont diminuées après 4 et 6 heures d'exposition (Chapitre III).

Enfin **une quantification des niveaux de transcrits pendant l'infection bactérienne a été réalisée à grande échelle afin d'étudier la cinétique des réponses moléculaires**. La technologie *RNA-seq* a été conduite sur des hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne. Des acteurs moléculaires clés de la réponse immunitaire des hémocytes de *M. edulis* ont été identifiés (Chapitre IV). Globalement, ils sont impliqués dans la voie des récepteurs Toll, dans la signalisation cellulaire et dans les processus d'adhésion des cellules, de phagocytose, de stress oxydant, d'apoptose et d'autophagie. De plus, des sur-régulations des gènes codant pour l'inhibiteur kappa B, l'inhibiteur d'apoptose, la protéine de tumeur D54, la protéine kinases sérine/thréonine SIK2 ont été observées lors d'exposition aux souches *V. splendidus* LGP32 et 7SHRW.

V.2 Discussion générale et perspectives

L'originalité de ce travail repose sur des expositions *in vitro* des hémocytes aux bactéries avec un suivi des réponses immunitaires à court terme. Dans la plupart des études fonctionnelles sur les espèces de *Mytilus*, les expositions se font par injection de bactéries dans le muscle adducteur postérieur (expositions *in vivo*) (Pallavicini *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009a; Gerdol *et al.*, 2011; Venier *et al.*, 2011; Philipp *et al.*, 2012) et les données sont issues de différents tissus (glande digestive, branchie, pied, muscles adducteurs, manteau et hémocytes) (Venier *et al.*, 2009; Philipp *et al.*, 2012). Dans ces études, les temps d'exposition des différents tissus aux bactéries sont plus longs allant de 3 à 48 heures contre 2 à 6 heures dans nos travaux.

L'extraordinaire complexité des organismes vivants est une grande barrière pour l'identification des composants individuels et de leurs fonctions biologiques basiques. Les études *in vitro* permettent une simplification du système d'étude et ont de ce fait prouvé leur puissance en physiologie cellulaire. De plus, les hémocytes sont les cellules fondamentales de l'immunité des moules. La façon dont les hémocytes vont réagir pour se défendre contre les bactéries est vraiment importante pour l'organisme dans son ensemble. Dès les premières heures de stimulation, le système immunitaire des mollusques se met en place. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser des études *in vitro* et ciblées sur les réponses hémocytaires précoces afin de réaliser une cinétique.

A- Les changements physiologiques lors de l'exposition des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32

Réponses morphologiques : capacité d'adhérence des hémocytes

Les hémocytes, placés sur une surface plate, tendent à développer des extensions cytoplasmiques (les pseudopodes) et à adhérer rapidement (Labreuche *et al.*, 2006a). Un grand nombre d'études conduites chez les espèces de bivalves ont montré que des espèces de *Vibrio*, connues pour être pathogènes pour les bivalves, sont capables de perturber la capacité des hémocytes à adhérer et provoquent ainsi un arrondissement des cellules. Par exemple, *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* induisent une perte de pseudopodes et un arrondissement des cellules des hémocytes de *M. edulis* (Lane et Birkbeck, 1999, 2000) et *V. splendidus* induit un arrondissement des hémocytes de *M. arenaria* après des expositions *in vitro* (Araya *et al.*, 2009) et *in vivo* (Mateo *et al.*, 2009a). Chez *R. phillipinarum* et *C. gigas*, des expositions à, respectivement, plusieurs souches de *V. tapetis* et à *V. aestuarianus* 01/32 ECPs entraînent une diminution des capacités d'adhésion des cellules (Choquet *et al.*, 2003; Labreuche *et al.*, 2006a). Nous avons montré que nos résultats avec les souches de *V. splendidus* LGP32 sont en accord avec ces études (Chapitre III).

L'arrondissement des cellules et, par conséquent, la perturbation des capacités d'adhésion induite par les bactéries sont liés à des mécanismes spécifiques associés avec la présence de composants à la surface des bactéries ou à leurs toxines excrétées (Lane et Birkbeck, 1999). Par exemple, dans les cellules humaines, la toxine de *V. cholera* (MARTXVc) est connue pour lier de façon covalente l'actine-G et dépolymériser l'actine-F conduisant à un arrondissement des cellules (Kudryashov *et al.*, 2008). Aussi, chez *V. anguillarum*, l'exotoxine RtxA cause l'arrondissement des cellules rénales du saumon Atlantique (Li *et al.*, 2008). Les métalloprotéases font également partie des facteurs sécrétés par les bactéries. Ce sont des éléments conservés chez les bactéries pathogènes (Hase et Finkekstein, 1993). Dans la majorité des cas, les métalloprotéases ont un effet cytotoxique sur les cellules et dégradent les tissus de l'hôte (Hase et Finkekstein, 1993). La métalloprotéase Vsm produite par *V. splendidus* LGP32 a des effets cytopathiques dans des

lignées cellulaires de mammifère et de mollusque causant l'arrondissement des cellules (Binesse *et al.*, 2008). Aussi, chez *M. arenaria*, cette métalloprotéase pourrait être liée à l'arrondissement des hémocytes (Araya *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2009a). Elle est considérée comme le principal facteur de toxicité affectant les mollusques bivalves (Binesse *et al.*, 2008). Cependant, les mêmes réponses ont été obtenues avec les souches LGP32-GFP et Δvsm , suggérant que le mutant de délétion de la métalloprotéase Vsm ne permet pas de diminuer la virulence de LGP32 chez les hémocytes de *M. edulis* en ce qui concerne la perte d'adhérence des cellules (Chapitre III). La toxine Vsm ne semble donc pas être la cause de l'augmentation des hémocytes non-adhérents.

Récemment, des études ont exploré les processus d'infection et pathogéniques de la souche *V. splendidus* LGP32 et la protéine externe de membrane (Omp) OmpU a été démontrée jouer un rôle essentiel dans la virulence de LGP32 lors d'infections d'huîtres (Duperthuy *et al.*, 2010; 2011). OmpU est une porine majoritaire de la membrane externe des *Vibrio*. Comme composant de la surface bactérienne, les Omps sont utilisées par l'hôte pour la reconnaissance du pathogène. En effet, les hémocytes des bivalves possèdent des récepteurs immunitaires hautement divers donnant une grande spécificité pour la reconnaissance du pathogène (Roger *et al.*, 2008; Moné *et al.*, 2010). Les Omps sont aussi utilisées par les pathogènes pour l'interaction et l'invasion avec les cellules hôtes, servant comme des protéines d'adhésion (les adhésines) (Negm and Pistole, 1999; Soulas *et al.*, 2000) ou des protéines d'invasion (les invasines) (Virji *et al.*, 1994; Sa *et al.*, 2010). Les Omps des pathogènes intracellulaires peuvent ainsi jouer un rôle intermédiaire dans l'adhérence avec la cellule hôte en stimulant la voie de traduction requise pour l'entrée bactérienne.

Par des travaux *in vitro* d'invasion des hémocytes et des expérimentations infectieuses, Duperthuy *et al.* (2011) ont montré que LGP32 est un pathogène facultatif intracellulaire qui envahit les cellules immunitaires des huîtres en utilisant OmpU comme une adhésine. Dans ce processus, l'invasion des huîtres par *V. splendidus* LGP32 requiert une opsonisation par la Cg-EcSOD, superoxyde dismutase extracellulaire de *C. gigas*, qui reconnaît la porine OmpU présente à la membrane externe du *Vibrio*. Le complexe *Vibrio*/ Cg-EcSOD est alors reconnu par l'intégrine- β hémocytaire qui provoque la polymérisation d'actine et de clathrine pour

l'internalisation du pathogène. Les souches de *V. splendidus* LGP32 de notre étude pourraient utiliser un processus similaire pour envahir les hémocytes de *M. edulis* et perturber le cytosquelette, augmentant le nombre d'hémocytes non-adhérents. Duperthuy *et al.* (2010) ont fabriqué un mutant de *V. splendidus* LGP32 dépourvu d'OmpU (*V. splendidus* LGP32 Δ OmpU) ; la même étude des réponses morphologiques des hémocytes de *M. edulis* avec ce mutant pourrait être envisagée afin de vérifier cette hypothèse.

Nous pouvons nous interroger sur le rôle et le devenir de ces hémocytes non-adhérents. Représentent-ils un réservoir de bactéries virulentes qui peuvent par la suite ré-émerger pour réinfecter de nouvelles cellules? Entrent-ils en apoptose? Certains pathogènes intracellulaires manipulent les réponses immunitaires de la cellule hôte en inhibant, en outre, les mécanismes d'apoptose et/ou d'autophagie pour se maintenir et se répliquer dans les cellules phagocytaires (Faherty et Maurelli, 2008; Deretic et Levine, 2009). A l'inverse, des bactéries pathogènes généralement extracellulaires induisent l'apoptose des cellules hôtes. Il n'y a aujourd'hui pas de données sur l'effet de *V. splendidus* sur les mécanismes de mort programmée des hémocytes de *M. edulis*. Cependant, grâce à notre banque d'ADNc (Chapitres II et IV), nous avons démontré que des acteurs clés de l'apoptose sont représentés dans le transcriptome hémocytaire de *M. edulis*. Les expériences avec du iodure de propidium (PI) et la cytométrie en flux sont largement utilisées pour l'évaluation de l'apoptose dans différents modèles expérimentaux (Riccardi et Nicoletti, 2006). De telles expériences pourraient être réalisées sur les hémocytes non-adhérents.

Réponses fonctionnelles : phagocytose et stress oxydant

Dans les cellules immunitaires, l'attachement des patrons moléculaires associés aux pathogènes (les PAMPs) grâce à des opsonines, des lectines ou des récepteurs liant les membranes se référant aux récepteurs de reconnaissance du patron (PRR), active la phagocytose (Janeway and Medzhitov, 2002). Ensuite, le processus d'enveloppement des particules étrangères est facilité par les réarrangements du cytosquelette d'actine, impliquant la formation de pseudopodes. Ainsi,

l'adhésion des cellules constitue une étape initiale de la phagocytose. Dans notre étude, les résultats sur les capacités des hémocytes à invaginer les billes de latex fluorescentes sont en corrélation avec les résultats sur l'adhésion des hémocytes (Chapitre III). De telles inhibitions de la phagocytose couplées avec un arrondissement des cellules ont déjà été obtenues avec des injections d'ECPs de *V. aestuarianus* 01/32 et des expositions *in vitro* à *V. splendidus* LGP32 chez les hémocytes de *C. gigas* et de *M. arenaria*, respectivement (Labreuche *et al.*, 2006a; Araya *et al.*, 2009).

V. aestuarianus échappe à la phagocytose par la sécrétion de produits extracellulaires inhibiteurs (Labreuche *et al.*, 2006a), alors que, comme on l'a discuté précédemment, chez *C. gigas*, *V. splendidus* LGP32 utilise la phagocytose comme une étape de son processus pathogénique (Duperthuy *et al.*, 2011). Dans le processus décrit, LGP32 reste viable et cultivable dans les hémocytes de *C. gigas* et les réactions de défense impliquées dans un contrôle efficace des bactéries phagocytées sont atténuées chez les hémocytes envahis (Duperthuy *et al.*, 2011). Ces phénomènes pourraient être liés à des sécrétions intracellulaires d'effecteurs bactériens par LGP32. De tels sécrétions intracellulaires ont récemment été montrées avec les effecteurs de sécrétion de type VI (T66SS) de *V. cholerae* (Ma and Mekalanos, 2010), qui sont aussi présents dans le génome de LGP32 (Le Roux *et al.*, 2009). Dans les hémocytes de *M. edulis*, les effecteurs bactériens sécrétés par LGP32 pourraient empêcher l'invagination des autres particules (dont les billes), d'où la diminution des capacités à invaginer les billes au cours du temps. Toutefois ceci n'est que spéculatif, une des premières étapes pour vérifier ces hypothèses pourrait être de suivre le devenir et la viabilité des *V. splendidus* LGP32 grâce à l'insertion du gène GFP qui confère une fluorescence verte lorsqu'il est excité par de la lumière UV.

Associée avec les activités phagocytaires, la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroxyle radical (OH^\cdot) ou dioxygène singulet (1O_2) par la NADPH oxydase et l'oxyde nitrite (NO) ou le peroxynitrite ($ONOO^\cdot$) par la NO synthase joue un rôle important dans les défenses de l'hôte contre les pathogènes en permettant l'oxydation de ces envahisseurs étrangers (Arumugam *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Novas

et al., 2004; Buggé *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009a). Le stress oxydant représente ces deux principales voies (Dröge, 2002). Incubés avec le PMA, un composé chimique qui stimule le stress oxydant, les hémocytes montrent une activation significative des ROS, suggérant que les hémocytes de *M. edulis* sont capables de produire des radicaux toxiques. La sonde utilisée (DCFH-DA) dans notre étude peut-être oxydée par le NO et le H₂O₂. Ainsi, les réponses observées peuvent être dues à une voie ou aux deux voies. Chez *M. galloprovincialis*, les voies de la NADPH oxydase et de la NO synthase ont été toutes les deux observées (Arumugam *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2009a). D'autres investigations sont nécessaires pour déterminer la voie responsable du stress oxydant chez les hémocytes de *M. edulis*.

Dans de nombreux cas, les bactéries pathogènes empêchent la production des ROS grâce à la production de produits cytotoxiques. Par exemple, différentes souches de *Vibrio* inhibent la capacité de production des ROS des hémocytes de *C. gigas* stimulés par du zymosan (Lambert *et al.*, 2003). Aussi, des expositions *in vitro* à *V. splendidus* LGP32 réduisent l'activité du stress oxydant des hémocytes de *M. arenaria* (Araya *et al.*, 2009) et la présence intracellulaire de LGP32 dans les hémocytes de *C. gigas* a été associée à une limitation de la production des ROS (Duperthuy *et al.*, 2011). Or, nous avons montré une activation significative du stress oxydant (Chapitre III). En raison de leur système immunitaire puissant, les moules du genre *Mytilus* sont considérées comme particulièrement résistantes à des infections par *Vibrio* (Ciacci *et al.*, 2010). De ce fait, ce système pourrait être moins sensible aux produits cytotoxiques sécrétés LGP32 que les autres bivalves, et ainsi une fois la phagocytose des bactéries réalisées, la production des radicaux toxiques pourrait se déclencher. A l'inverse, quelques études ont décrit les capacités des espèces de *Vibrio* ou de leurs ECPs à exercer des réponses cellulaires via la génération de stress oxydant (Labreuche *et al.*, 2006a, b; Buggé *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009a). Labreuche *et al.* (2006a) ont suggéré qu'une sur-activation de la production des ROS pourrait promouvoir une cytotoxicité chez les hémocytes hôtes, permettant aux cellules de *Vibrio* de surmonter les défenses cellulaires de l'hôte, facilitant la croissance bactérienne et leur dissémination dans l'hôte. Ainsi, les hémocytes, sources des radicaux toxiques peuvent aussi en devenir les cibles. La souche LGP32 pourrait également avoir adopté cette stratégie dans les hémocytes de moules. Nos résultats ont montré qu'en présence de la souche dérivée LGP32 Δvsm , la production des

radicaux toxiques est atténuée. La présence de la métalloprotéase Vsm pourrait donc avoir un lien avec l'activation du stress oxydant. Des études complémentaires sur les mécanismes d'induction des radicaux toxiques par *V. splendidus* LGP32 permettraient de vérifier ces hypothèses.

B- Les acteurs moléculaires impliqués dans réponses immunitaires des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32

Dans ce travail de thèse, une banque d'ADNc normalisée, construite à partir des hémocytes soumis ou non à une surcharge bactérienne, a tout d'abord été pyroséquencée. Elle a permis d'identifier le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre II). Ensuite, dans le but de quantifier les transcrits potentiellement impliqués dans la réponse hémocytaire, la technologie *RNA-Seq* (séquençage Illumina) a été réalisée à partir des hémocytes exposés 0, 2, 4 et 6 heures à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre IV). Cette étude a permis de compléter le transcriptome hémocytaire de *M. edulis* en réponse à l'exposition bactérienne et d'identifier des acteurs moléculaires clés de la réponse immunitaire. Aussi, des analyses des niveaux de transcrits en multiplex par une technologie d'ADN branché ont été réalisées afin d'identifier le sens de régulation, dès les premières heures d'exposition, de transcrits potentiellement intéressants (Chapitres III et IV).

Les récepteurs de reconnaissance du patron (PRRs)

La première étape des réponses immunitaires commence en dehors des cellules par la détection et la reconnaissance du « non-soi » par le système de l'immunité innée. Différentes protéines et récepteurs, apparentés aux récepteurs de reconnaissance du patron (PRRs pour *pattern recognition receptors*) tels que les lectines, les récepteurs Toll (TLRs) et les récepteurs de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs) reconnaissent et se lient à différentes molécules à la surface des microorganismes.

Les lectines forment une grande famille de protéines se liant spécifiquement à certains glucides et présentent une grande diversité structurale. Elles sont sous forme solubles ou associées aux membranes et permettent d'identifier le « non-soi » grâce à la reconnaissance des structures de glucides présents à la surface des microorganismes (Vasta et Marchalonis, 1987). Plusieurs lectines ont été décrites chez les bivalves, incluant les lectines de types C, S (les galectines), F (les fucoselectines) et de type fibrinogène (Tasumi et Vasta, 2007; Kim *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Gorbushin et Iakovleva, 2011; Venier *et al.*, 2009, 2011).

Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis*, seulement deux types de lectines ont été identifiées : des galectines et des protéines apparentées aux fibrinogènes (FREPs) (Chapitre II et IV). Ces protéines semblent toutes les deux régulées lors de l'exposition bactérienne (Chapitre IV). Les galectines sont solubles, caractérisées par la présence d'une séquence d'acides aminés très conservée au cours de l'évolution qui est impliquée dans la liaison spécifique aux résidus glucidiques et ont une affinité particulière avec les β -galactosides. Elles jouent des rôles fondamentaux dans les réponses immunitaires des vertébrés et des invertébrés. Notamment, chez différentes espèces de bivalves, les galectines se lient à la surface de parasites comme des PRRs (Tasumi et Vasta, 2007; Kim *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2010) et les transcrits sont sur-régulés après des expositions à *Perkinsus olseni*, *V. tapetis* et *V. alginolyticus* (Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Les FREPs contiennent en position C-terminale un domaine de type fibrinogène mais différent par leur région N-terminale. Elles jouent aussi un rôle important dans les réponses

immunitaires des invertébrés contre les pathogènes en tant que PRRs (Adema *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008, 2009; Romero *et al.*, 2011). Chez *M. galloprovincialis*, un ensemble de séquences de FREPs très diversifiées entre les individus et chez un même individu a été identifié, suggérant l'existence d'un système primitif qui a la capacité à reconnaître et éliminer différents types de pathogènes (Romero *et al.*, 2011). Ces diverses observations nous font penser que les galectines et les FREPs identifiés dans notre étude ont un rôle de PRRs. Ces protéines semblent impliquées dans la reconnaissance de *V. splendidus* LGP32 en se liant avec ces bactéries. Toutefois, des études complémentaires sur les différents types de galectines et de FREPs et leur rôle exact sont nécessaires.

Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs) se lient spécifiquement au principal composant de la paroi bactérienne, le peptidoglycane. Cette famille de protéines influence les interactions hôtes-pathogènes par leurs propriétés pro- et anti-inflammatoires qui sont indépendantes de leurs activités antibactériennes et d'hydrolyse (Moreira *et al.*, 2012). Des PGRPs ont été identifiées chez différents bivalves (Ni *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2007; Itoh and Takahashi, 2008; Moreira *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012). A notre connaissance, les PGRPs n'ont pas encore été identifiées chez les espèces du genre *Mytilus*. Dans la banque d'ADNc normalisée, nous avons identifié un transcrit homologue à la PGRP 1S1 de *C. gigas* (Chapitre II). Toutefois, nous n'avons pas retrouvé d'homologies avec des PGRPs dans le transcriptome issu du séquençage *Illumina* (Chapitre IV). D'autres études pourront être entreprises afin de déterminer si des gènes codants des PGRPs sont bien présents chez les hémocytes de *M. edulis* et s'ils sont régulés lors d'une exposition bactérienne.

Les récepteurs de type Toll (TLRs) sont des PRRs qui reconnaissent les bactéries, les champignons et les virus à la surface cellulaire. Ils contrôlent alors l'expression de molécules qui vont s'opposer aux agents infectieux, soit directement, soit en permettant le recrutement et l'activation de cellules effectrices. Les TLRs sont caractérisés par un domaine extracellulaire

récepteur du signal de danger composé de répétitions riches en leucines (motifs LRR pour *leucine-rich repeats*), d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire présentant des homologies avec le domaine Toll/IL-1R (TIR) et permettant la transduction du signal d'activation pour générer les réponses immunitaires (Takeuchi et Akira, 2010). Certains TLRs peuvent former des hétérodimères, ce qui leur permet d'élargir le spectre des molécules reconnues (Imler, 2004). Les voies de signalisation des TLRs sont séparées en 2 groupes: une voie dépendante de MyD88 qui mène à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, l'IL-1 ou l'IL-6) avec une activation rapide des voies de NF- κ B, MAPK et AP1, et une voie indépendante de MyD88 associée avec l'induction de IFN-beta et de gènes inductibles par IFN.

Des TLRs ont été identifiés chez différentes espèces de bivalves et pour certains, l'expression hémocytaire est induite par différentes bactéries ou LPS (Qiu *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011a; Venier *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2012; Philipp *et al.*, 2012). La diversification des TLRs peut jouer un rôle essentiel dans le contrôle des communautés microbiennes (Philipp *et al.*, 2012). Aussi, dans le transcriptome hémocytaire de *M. edulis*, différents types de TLRs ainsi que différentes molécules de la voie de signalisation des TLRs ont été mis en évidence (Chapitres II et IV) et certains semblent régulés en présence de *V. splendidus* LGP32 (Chapitre IV). La plupart des molécules identifiées appartiennent à la voie des TLRs dépendante de MyD88, telles que MyD88, IRAK-4, TRAF-6, TAK1, MKK et IKK et presque toutes les molécules intervenant dans cette voie semblent présentes. De ce fait, nous pouvons présager l'implication de la voie des récepteurs Toll dans la réponse immunitaire précoce des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32.

Comme discuté précédemment, Duperthuy *et al.* (2011) ont récemment montré que *V. splendidus* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif. De façon intéressante, nous avons cherché à savoir si les hémocytes de *M. edulis* possèdent des PRRs intracellulaires permettant la reconnaissance de motifs bactériens intracellulaires. Les récepteurs NOD-like (NLRs) (NOD pour *nucleotide-binding oligomerization domain*) sont connus pour jouer un rôle majeur dans la reconnaissance des bactéries intracellulaires et générer les réponses immunitaires. Nous n'avons

pas identifié de NLRs dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis*. De la même façon, Philipp *et al.* (2012) n'ont pas mis de NLRs en évidence dans les transcriptomes de différents tissus stressés de *M. edulis*. De plus, les constituants clés de la voie des NLRs, tels que RIP2 (*receptor-interacting protein kinase 2*) et ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) qui agissent comme des molécules adaptatrices pour différents NLRs (Rosenstiel *et al.*, 2008), aussi bien que la Caspase 1, activée par les inflammasomes formés par les NLRs (Bortoluci and Medzhitov, 2010) ne semblent pas présents. Existe-t-il des PRRs intracellulaires chez *M. edulis* ? Des études complémentaires permettraient peut-être d'en identifier, ou d'identifier des molécules jouant un rôle de PRR intracellulaires.

Chez les vertébrés, le système du complément C1q est considéré comme une protéine de reconnaissance du patron versatile (PRP), se liant directement à une large variété de PAMPs des bactéries, virus et parasites. Les protéines C1q sont impliquées dans divers processus cellulaires et sont considérées comme un lien principal entre l'immunité innée et l'immunité acquise (Kishore et Reid, 2000; Kishore *et al.*, 2004). Chez les bivalves, des gènes codant des C1q ont été identifiés et différentes études ont montré qu'ils sont impliqués dans la reconnaissance des microorganismes envahissants probablement comme des PRPs (Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010 ; Gestal *et al.*, 2010 ; Venier *et al.*, 2011). Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis*, beaucoup de séquences relatives au complément C1q ont été identifiées. Ces transcrits sont régulés lors de l'exposition bactérienne (Chapitres II, III et IV). Par ailleurs, l'analyse en multiplex par la technologie de l'ADN branché a montré que les niveaux des ARNm de C1q-DC sont diminués après 4 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre III). Ces observations sont en contradiction avec des études menées chez les hémocytes de *M. galloprovincialis* qui ont montré que des bactéries Gram⁺ (*Micrococcus lysodeikticus*) et Gram⁻ (*V. anguillarum*) induisent une augmentation des niveaux de transcrits de C1qDC (Gestal *et al.*, 2010; Gerdol *et al.*, 2011). La sous-régulation que nous avons observée pourrait refléter des processus de pathogénicité moléculaire de la souche LGP32 pour éviter les défenses immunitaires des hémocytes. De plus, Gestal *et al.* (2010) ont également révélé une grande

diversité de C1q, suggérant que ces molécules peuvent avoir des fonctions variées expliquant les différents niveaux de régulation. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour définir si ces molécules ont des fonctions autres que la reconnaissance du patron.

Les voies de signalisation cellulaire

La famille de facteurs de transcription du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B)/Rel a un rôle central dans la coordination de l'expression d'une grande variété de gènes qui contrôlent les processus cellulaires tels que la prolifération, la survie et l'immunité (Li et Verma, 2002). NF- κ B mène notamment à la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Une grande variété de signaux tels que les PRRs dont les TLRs, les membres de la famille des cytokines tels que le TNF (pour *tumour necrosis factor*) et l'interleukine-1 (IL-1) mènent à l'activation de NF- κ B. NF- κ B est un homo- ou hétérodimère formé à partir de cinq sous-unités. L'hétérodimère p50:p65 constitue la forme classique de NF- κ B. Les membres de la famille des NF- κ B existent sous forme inactive dans le cytoplasme par l'interaction avec des inhibiteurs appelés inhibiteurs kappa B (I κ B) (Vallabhapurapu and Karin, 2009). Des homologues de NF- κ B et des composants de cette cascade de signalisation ont été identifiés chez les bivalves (Gueguen *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2009; Green et Barnes, 2009; Venier *et al.*, 2011; Philipp *et al.*, 2012) ainsi que dans notre étude (Chapitre IV). En effet, nous avons notamment mis en évidence des homologies avec un membre de la famille des Rel (p50), un inhibiteur I κ B, une protéine IKK-like (IKK α) ainsi que MyD88, TRAF-2, 5 et 6, IRAK-1, 4, TAK-1 et TAB. Les niveaux de transcrits codant pour I κ B sont augmentés après 4 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre IV) et de la même façon, les ARNm de I κ B sont sur-régulés chez les huîtres stimulées par *V. alginolyticus* (Green et Barnes, 2009), suggérant une activation de la voie des NF- κ B/Rel en présence de ces bactéries. Par contre, chez *A. irradians*, une sous-régulation des niveaux de transcrits de Ai κ B après 3 heures d'exposition à *Listonella anguillarum* a été observée (Mu *et al.*, 2010). Les réponses de la voie des NF- κ B semblent donc être modulées selon l'hôte et

l'espèce bactérienne mais nous pouvons penser que la voie des NF- κ B est bien impliquée dans la réponse immunitaire des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32.

La voie de transduction des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK pour *Mitogen-activated protein kinase*) est constituée par une famille de kinases à sérines/thréonines impliquées dans divers processus cellulaires incluant la croissance, le cycle cellulaire, le stress et les défenses de l'hôte (Travers *et al.*, 2009). Comme l'activation de NF- κ B, l'activation des MAPK peut se faire par des signaux tels que des PRRs dont les TLRs, des cytokines telles que le TNF et l'interleukine-1 (IL-1). Puis, la transduction du signal se fait à travers une cascade de phosphorylations impliquant deux voies principales de signalisation : la voie des JNK (pour *c-jun N-terminal kinases*) et la famille des kinases p38 (Cowan et Storey, 2003). MAPK p38 et JNK activent la transcription du facteur activateur de protéine 1 (AP-1) impliqué dans le contrôle de la synthèse des cytokines inflammatoires (Mogensen, 2009). L'activation de la cascade des MAPK et des autres kinases en réponses aux bactéries a été identifiée chez les hémocytes de divers bivalves (Canesi *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2004, 2005; García-García *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2009; Araya *et al.*, 2010). Pour les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32, les composants de la voie des JNK et p38 MAPK sont bien représentés et la protéine AP-1 semble régulée (Chapitre IV) ce qui laisse penser à une implication de cette voie dans le système immunitaire de *M. edulis*.

La capacité des bactéries à moduler les réponses immunitaires chez les mollusques a été attribuée à l'activation ou l'interférence avec les voies de signalisation, notamment celle des MAPK (Canesi *et al.*, 2005; Travers *et al.*, 2009). De ce fait, des travaux pourraient être envisagés afin de déterminer si les *Vibrio* interfèrent avec ces voies de signalisation.

Les cytokines et la voie des JAK/STAT

Les cytokines sont des facteurs solubles de communication reconnues comme des molécules de régulation des réponses immunitaires et de l'homéostasie (Cohen et Cohen, 1996; Ottaviani, 2006). Chez les bivalves, quelques protéines homologues aux cytokines des vertébrés (TNF- α pour *Tumor Necrosis Factor*; les interleukines IL-16, IL-17 et IL-1), et à leurs récepteurs (IL-1R et IL-2R) ont été identifiées (Hughes *et al.*, 1991; Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2008; Philipp *et al.*, 2012). L'interféron (IFN) n'a, à notre connaissance, pas été mis en évidence chez les bivalves. Dans le transcriptome de *M. edulis*, aucune séquence homologue à IFN ou à des IL n'a été identifiée. Cependant, un récepteur d'IL (récepteur IL-1 associé à la kinase 4) a été mis en évidence.

Plusieurs études ont décrit les réponses des hémocytes engendrées par le TNF- α et ont mis en évidence l'importance de cette cytokine ainsi que de ses récepteurs chez les bivalves (Betti *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Philipp *et al.*, 2012). Les domaines extracellulaires des membres de cette famille sont tous semblables, mais les domaines cytoplasmiques des récepteurs se rangent en deux catégories qui activent des voies distinctes. L'une conduit à l'apoptose et l'autre à l'activation des régulateurs de transcription contrôlant l'inflammation et d'autres réponses immunitaires. Dans le transcriptome de *M. edulis*, des transcrits homologues aux TNF- α et à leur récepteurs ont été mis en évidence. Aussi des séquences codantes pour des protéines adaptatrices des récepteurs TNF telles que les protéines TRAF (pour *TNF receptor-associated factors*) ont été identifiées (Chapitre IV). Les TRAF conduisent notamment à l'activation de régulateurs de transcription, en particulier NF- κ B, décrit précédemment. Certaines de ces molécules semblent régulées chez les hémocytes exposés à *V. splendidus* LGP32, suggérant leur implication dans les réponses immunitaires précoces des moules.

La voie des Janus kinases/transducteurs de signal et activateurs de transcription (JAK/STAT) est induite par des cytokines. Dans cette cascade, la liaison des cytokines à leurs récepteurs permet aux JAK, appartenant à la famille des tyrosines kinases, d'activer les STATs. Une fois activés, ils

se dimérisent et sont transloqués dans le noyau où ils modulent l'expression de gènes impliqués dans les réactions immunitaires. En plus de l'activation des STATs, les JAKs servent d'intermédiaires dans le recrutement de molécules telles que les MAPK. Des études ont suggéré la présence de la voie des JAK/STAT chez les bivalves, notamment chez *M. edulis* (Philipp *et al.*, 2012). Nous avons montré que des JAK, des STATs et la plupart des composants de cette cascade, dont les SOCS (pour *Suppressor of cytokine signaling*) essentiels dans le contrôle de la production des cytokines, sont présents dans les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre IV). Cependant, aucune homologie avec les cytokines et les récepteurs de cytokines qui activent les JAK n'a été trouvée. Des études pourraient donc être entreprises afin de déterminer les molécules responsables de l'activation de la voie des JAK/STAT chez *M. edulis*.

Les inhibiteurs de protéases et les protéines de stress

Les protéases sécrétées par les pathogènes sont d'important facteurs de virulence. Elles facilitent l'infection, diminuent l'activité des lysozymes et empêchent la capacité d'agglutination des hémocytes (Moreira *et al.*, 2012). *Vibrio splendidus* LGP32 sécrète notamment des métalloprotéases extracellulaires dont la toxicité a été démontrée (Le Roux *et al.*, 2007; Binesse *et al.*, 2008). Chez les bivalves, pour se protéger de ces facteurs virulents, il existe des inhibiteurs de protéases qui agissent, entre autres, en inactivant directement les protéases de pathogènes (Gestal *et al.*, 2008 ; Rimphanitchayakit et Tassanakajon, 2010). Par exemple, chez les huîtres *C. gigas*, l'expression des gènes codant pour Cg-TIMP, un inhibiteur de métalloprotéases est induite par un mélange de plusieurs *Vibrio* (Montagnani *et al.*, 2001, 2007). Aussi, chez les bivalves *Argopecten irradians* et *Chlamys farreri*, l'expression des inhibiteurs de protéases de type Kazal (KPI) est augmentée par des infections par *V. anguillarum* (Zhu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Nous n'avons pas identifié de TIMP chez *M. edulis*. Toutefois, des séquences ayant des homologies avec divers inhibiteurs de protéases tels que les serpins, les alpha-macroglobulines et les inhibiteurs de protéases à sérine, à cystéine, et de type Kazal ont été mis en évidence (Chapitre IV). Certaines de ces molécules, notamment les KPI sont régulées dans les hémocytes

exposés à *V. splendidus* LGP32, pouvant suggérer un rôle de ces molécules contre les protéases sécrétées par LGP32.

La synthèse des protéines de choc thermique (HSPs pour *Heat shock proteins*) est un moyen de défense développé par la cellule pour faire face aux diverses agressions auxquelles elle peut être soumise. En tant que chaperons, les HSPs participent aux mouvements intracellulaires des protéines, préviennent l'agrégation des protéines altérées, éliminent les protéines anormales et contribuent à la conformation correcte des peptides nouvellement synthétisés (Kourtidis *et al.*, 2006). En plus de leur rôle de chaperons moléculaires, les HSPs ont aussi des fonctions importantes dans les réponses immunitaires innées (Wallin *et al.*, 2002). Chez les bivalves, elles sont bien étudiées (Boutet *et al.*, 2003; Piano *et al.*, 2004; Franzellitti et Fabri, 2005; Cellura *et al.*, 2006; 2007; Song *et al.*, 2006) et des expositions à des bactéries pathogènes induisent l'expression des HSPs (Song *et al.*, 2006; Cellura *et al.*, 2006, 2007; Araya *et al.*, 2010). Beaucoup de séquences présentant des homologies avec divers HSPs ont été mises en évidence dans le transcriptome de *M. edulis* exposé à *V. splendidus* LGP32 (Chapitres II et IV) et semblent régulées (Chapitre IV). La grande variabilité des HSPs retrouvée chez les hémocytes des moules pourrait leur permettre d'exécuter leurs différentes fonctions dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Les métallothionéines (MTs) sont également des protéines de réponse aux stress. Elles se lient aux métaux et sont impliquées dans la détoxification des métaux lourds, dans la régulation des métaux physiologiques et dans la protection contre le stress oxydatif. Chez les mammifères, les MTs ont aussi un rôle dans les défenses de l'hôte contre les pathogènes (Emeny *et al.*, 2009). Nous avons identifié des métallothionéines de moules dans les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 suggérant un potentiel rôle de ces protéines dans les défenses immunitaires. D'autres études pourront être entreprises afin de vérifier si elles sont régulées et leurs rôles possibles notamment dans la protection contre le stress oxydatif ou encore l'apoptose.

Adhésion des cellules et communication

Le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 a aussi révélé de nombreux transcrits impliqués dans l'adhésion des cellules et la communication. Parmi eux, une intégrine- β a été identifiée (Chapitre IV). Les intégrines sont des récepteurs cellulaires transmembranaires pour des protéines de la matrice extracellulaire qui jouent un rôle important dans les processus de développement et les processus pathologiques (Barczyk *et al.*, 2010). Chez les mollusques, comme chez d'autres invertébrés, les intégrines sont impliquées dans des processus hémocytaires d'adhésion, de diffusion (Davids et Yoshino, 1998; Ballarin *et al.*, 2002), de dégranulation, de phagocytose (Johansson et Soderhall 1989; Wittwer et Wiesner 1996) et d'encapsulation (Pech et Strand 1995). Chez les huîtres *C. gigas*, l'intégrine- β joue un rôle important dans la phagocytose (Terahara *et al.*, 2006) et comme nous l'avons discuté précédemment *V. splendidus* LGP32 utilise l'intégrine- β pour la signalisation de son internalisation (Duperthuy *et al.*, 2011). Des études complémentaires pourraient être intéressantes afin de vérifier si l'intégrine- β de *M. edulis* joue les mêmes rôles que chez les huîtres et si *V. splendidus* l'utilise pour son internalisation.

De plus, un récepteur de laminine (LR) a également été identifié (Chapitre IV). Les LR sont des glycoprotéines transmembranaires. Ils jouent d'important rôles dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, dans l'adhésion entre les cellules et dans l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Montuori *et al.*, 1999). Il existe peu d'études des LR chez les bivalves (Fu *et al.*, 2008 ; You *et al.*, 2012). Toutefois, You *et al.* (2012) suggèrent un rôle des LR dans l'adhésion cellulaire et l'apoptose chez le bivalve *Meretrix meretrix*. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si le LR de *M. edulis* a également des rôles dans l'adhésion cellulaire et l'apoptose. De plus, on peut s'interroger sur le lien entre ce récepteur et la formation d'hémocytes non-adhérents lors de l'exposition à *V. splendidus* LGP32 : les facteurs virulents de LGP32 interfèrent peut-être avec ce LR pour diminuer l'adhérence des hémocytes.

La phagocytose et les molécules impliquées

La phagocytose joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense de l'hôte à travers la capture et l'élimination des pathogènes. Après la reconnaissance et les migrations chimiotactiques des hémocytes vers les pathogènes envahissants, le contact entre les bactéries et la membrane des phagocytes induit une modification du cytosquelette avec la formation de pseudopodes qui englobent les bactéries. Ces dernières se retrouvent alors dans des vacuoles de phagocytose, les phagosomes. Les phagosomes acquièrent progressivement des caractéristiques digestives (Flannagan *et al.*, 2009). A la suite de la fusion des phagosomes avec les lysosomes (phagolysosomes), diverses molécules vont participer à la digestion des agents pathogènes telles que le lysozyme, les cathepsines, les hydrolases, les peptides antimicrobiens, etc. Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32, de nombreux transcrits codants pour des protéines du cytosquelette et des hydrolases lysosomales telles que des cathepsines, des glycosidases, des sulfatases et des lipases ont été identifiées ainsi que le lysozyme et divers peptides antimicrobiens (AMPs) (Chapitres II et IV). Certains sont régulés en présence de *V. splendidus* LGP32 (Chapitres III et IV). Or, comme nous en avons déjà discuté, les bactéries *V. splendidus* LGP32 survivent-elles dans les hémocytes de *M. edulis* ou sont-elles digérées par ces molécules? Pour répondre à ces questions, des études supplémentaires sont à envisager.

Les AMPs comme le lysozyme peuvent interagir directement avec les bactéries envahissantes en causant la lyse de leur paroi (Hancock and Rozek, 2002). Ils sont stockés dans des granules sous les formes actives et, après stimulation, ils sont engagés dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagocytes, avant d'être libérés par exocytose dans l'hémolymph pour participer à des réponses systémiques (Mitta *et al.*, 1999a; Li *et al.*, 2008). Différentes familles d'AMPs ont été décrites chez les moules et sont hautement représentées dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 (Chapitres II et IV). Des transcrits relatifs à MGD2b, aux mytilines B, C et D, aux myticines A, B et C et à la mytimycine ont été identifiés. Beaucoup sont régulés lors de l'exposition bactérienne (Chapitre IV). Une sous-régulation de

plusieurs transcrits codant pour des AMPs a été mesurée chez des moules injectées avec *V. splendidus* LGP32 (Venier *et al.*, 2011). Par l'analyse en multiplex, nous avons également montré une sous-régulation des transcrits de la défensine après 4 et 6 heures d'exposition (Chapitre III). Comme suggéré par Duperthuy *et al.* (2011), *Vibrio splendidus* LGP32 pourrait exercer ses effets pathogènes lorsqu'il se trouve dans les cellules hôtes. L'un des ses effets pourrait bien être de diminuer les capacités de défense des cellules hôtes par l'abaissement des niveaux de transcrits codants pour des AMPs. Aussi, par l'analyse en multiplex, nous avons montré une sur-régulation des transcrits codant pour le lysozyme à 2 heures d'exposition puis une sous-régulation à 4 et 6 heures (Chapitre III). Une augmentation de l'activité du lysozyme dans l'hémolymphes en réponses à des bactéries a été observée chez différentes espèces de bivalves (Pruzzo *et al.*, 2005; Allam *et al.*, 2006; Ciacci *et al.*, 2009). Ainsi, la sur-régulation observée chez *M. edulis* pourrait représenter une réponse précoce contre les bactéries dans le but de produire du lysozyme. Puis, la sous-régulation pourrait s'expliquer, comme pour les AMPs, par la toxicité de *V. splendidus* LGP32. Aussi, le mécanisme cellulaire pourrait ajuster les taux d'enzymes protéolytiques aux besoins réels.

Nous avons également constaté un nombre important de séquences relatives à des myticines C (Chapitre IV). Les transcrits de myticine C présentent un inhabituel et haut niveau de polymorphisme d'importance biologique non identifiée (Pallavicini *et al.*, 2008 ; Costa *et al.*, 2009b). Une récente étude *in vivo* et *in vitro* sur des hémocytes de *M. galloprovincialis* a montré qu'une surexpression de la myticine C est capable d'altérer l'expression de certains gènes immunitaires comme ceux codants pour la myticine B, la mytiline B, la C1qDC et le lysozyme suggérant que la myticine C pourrait agir en tant que molécule modulatrice du système immunitaire. Elle a, de plus, des propriétés antimicrobiennes et chimiotactiques (Balseiro *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que la myticine C pourrait être considérée, non seulement comme un AMP, mais aussi comme la première molécule « *chémokine/cytokine-like* » identifiée chez les bivalves (Balseiro *et al.*, 2011). De plus, ce vaste répertoire de séquence de myticine C pourrait être lié au haut degré de résistance aux maladies observées chez *M. edulis*.

Le stress oxydant

Le stress oxydant est causé par un déséquilibre entre la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) et les capacités du système biologique à détoxifier ces ROS ou à facilement réparer les dommages résultants. Associés avec les activités phagocytaires, la production de ROS cytotoxiques est un mécanisme général de protection chez la plupart des espèces et constitue une étape critique pendant laquelle les pathogènes potentiels et les parasites sont éliminés. Chez les bivalves, la NADPH oxydase aussi bien que l'oxyde nitrique (NO) synthase peuvent être activés pour produire des radicaux toxiques (Arumugan *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Novas *et al.*, 2004; Buggé *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009a;). Nous avons montré que les hémocytes de *M. edulis* sont capables de produire des radicaux toxiques (chapitre III). En parallèle, le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* révèle des transcrits codant pour la NADPH oxydase ainsi que des composants de la voie d'activation de la NADPH oxydase (Chapitre II et IV). En revanche, nous n'avons pas révélé de transcrits relatifs à la NO synthase. Il semblerait donc que voie responsable du stress oxydant chez les hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 soit la voie de la NADPH oxydase.

Pour protéger les cellules vivantes des dommages causés par les ROS endogènes, des antioxydants sont activés afin d'éliminer les radicaux libres en les convertissant en des composés moins toxiques (Yu *et al.*, 2011). Dans le transcriptome hémocytaire de *M. edulis* exposé à *V. splendidus* LGP32, nous avons mis en évidence des transcrits codants pour des protéines antioxydantes tels que la glutathion peroxydase, la glutathion S-transférase, la superoxyde dismutase, la protéine kinase sérine/thréonine, la sélénoprotéine de membrane P. De façon anormale, chez les hémocytes de *M. edulis*, une activation significative du stress oxydant en présence de *V. splendidus* LGP32 a été décrite alors que les transcrits codants pour la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase sont sous-régulés (Chapitre III). Ces régulations résultent probablement de la pathogénèse de *V. splendidus* LGP32 qui est capable d'altérer les fonctions hémocytaires et permettre la survie des bactéries dans l'hôte.

La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée, incluant l'apoptose et l'autophagie, est une réponse immunitaire fondamentale à différents stress. Outre l'activation par les voies inflammatoires telles que l'activation par les TNF- α ou les Fas, l'apoptose comme l'autophagie peut être déclenchée par les ROS (Fulda *et al.*, 2010).

L'autophagie joue un rôle direct dans l'élimination des pathogènes intracellulaires par digestion dans des autolysosomes. Aussi, dans le système immunitaire, le rôle du système autophagique a récemment été identifié comme régulateur, en tant qu'effecteur antimicrobien des TLRs et d'autres voies de signalisation par des PRRs (Delgado *et al.*, 2009) ainsi que dans la phagocytose des pathogènes (Sanjuan *et al.*, 2007). Les acteurs principaux du processus autophagique incluent un inhibiteur clé, mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) et un large groupes de gènes en relation avec l'autophagie, les ATGs (pour *autophagy-related gene*) responsables de l'induction de l'autophagie et de la formation des autophagosomes (Philipp *et al.*, 2012). Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus*, nous avons identifié des transcrits codant pour des mTOR et des membres de la famille des ATG tels que beclin-1. *V. splendidus* LGP32 est un pathogène intracellulaire et, comme déjà suggéré par Philipp *et al.* (2012), *M. edulis* semble posséder un système complexe d'autophagie. Il serait donc intéressant d'explorer davantage ce processus et d'identifier si des membres sont régulés en présence de LGP32.

L'apoptose joue un rôle clé dans l'homéostasie et la fonction du système immunitaire, dans la défense contre les parasites et les agents pathogènes ainsi que dans la reconnaissance du « soi / non soi » chez les vertébrés et les invertébrés (Sokolova, 2009; Kiss, 2010). Une caractéristique clé de la majorité des voies apoptotiques est l'implication d'une famille de protéases appelées « caspases ». Les caspases clivent les protéines cibles sur des sites spécifiques généralement contenant des résidus d'acide aspartique et une séquence de trois acides aminés spécifique des caspases (Creagh *et al.*, 2003). Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V.*

splendidus LGP32, nous avons identifié divers transcrits codant pour les voies pro- ou anti-apoptotiques tels que des caspases, le FADD (pour *Fas-associated death domain*) et les inhibiteurs d'apoptose et, comme déjà discuté précédemment, des récepteurs du TNF (Chapitres II et IV). Certains semblent régulés lors de l'exposition bactérienne. Notamment, un transcrit codant pour des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) est sur-régulés après 4 et 6 heures d'exposition à *V. splendidus* LGP32 (Chapitre IV). Les IAPs agissent directement en inhibant les caspases (Zhang *et al.*, 2011b). La sur-expression pourrait suggérer que les IAPs régulent l'apoptose qui a pu être déclenchée lors de l'exposition bactérienne. Est-ce une manipulation de LGP32 pour se maintenir et se répliquer dans les cellules phagocytaires ? Des études supplémentaires pourront vérifier cette hypothèse.

C- Différences de pathogénicité entre les souches de *V. splendidus* LGP32 et 7SHRW

V. splendidus LGP32 a été associée avec des événements de mortalité estivale massive de juvéniles d'huîtres *C. gigas* en France (Gay *et al.*, 2004a, b). Habituellement, les plus fortes réponses des hémocytes *in vitro* sont dirigées contre les bactéries isolées à partir d'hôtes malades de la même espèce que l'animal source (Lane et Birkbeck, 2000). Ainsi, *V. splendidus* LGP32 n'apparaît pas comme un pathogène naturel de moules. Néanmoins, cette souche s'est aussi révélée affecter différentes fonctions normales des hémocytes de plusieurs espèces de bivalves tels que les clams *R. philippinarum* et *M. arenaria* et les moules *M. galloprovincialis* et *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2008; Ciacci *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2009a, b; Venier *et al.*, 2011). Les souches relatives à *V. splendidus* sont largement distribuées dans divers environnements et disposent d'une diversité génétique élevée. De ce fait, elles peuvent être associées avec une large gamme d'hôte (Gay *et al.*, 2004a). Aussi, Mateo *et al.*

(2009a) ont émis l'hypothèse que les hémocytes des bivalves peuvent partager les récepteurs pour les mêmes toxines produites par *V. splendidus* LGP32.

V. splendidus 7SHRW est une souche environnementale isolée à partir de sédiments marins de l'Ile du Prince Edouard (Mateo *et al.*, 2009a). Elle induit de faibles effets sur les réponses immunitaires fonctionnelles et moléculaires des hémocytes de *M. arenaria* et de *M. edulis* comparé à LGP32 qui entraîne des réponses importantes (Mateo *et al.*, 2009a; Chapitre III). Nous en avons conclu que la souche 7SHRW pourrait se révéler être un contrôle négatif de pathogénicité chez les hémocytes de *M. edulis* (Chapitre III). La souche 7SHRW est endémique de l'Ile du Prince Edouard, lieu où les moules ont été récoltées alors que la souche LGP32 a été isolée à partir des huîtres collectées en France. De ce fait, nous pouvons postuler que les hémocytes des moules répondent différemment selon les isolats de *V. splendidus*.

Aussi, le système immunitaire des bivalves est connu pour avoir des capacités de discrimination envers les microorganismes (Bachère *et al.*, 2004). L'existence d'interactions spécifiques entre les hémocytes de différents bivalves et des souches diverses de *Vibrio* a été montrée par des études dans lesquelles une variété de réponses phénotypiques a été évaluée *in vitro* (Nottage and Birkbeck, 1990; Choquet *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2003; Araya *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009a;) et *in vivo* (Gay *et al.*, 2004a; Parisi *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2009a; Ciacci *et al.*, 2010). La capacité des bactéries à moduler les réponses immunitaires des mollusques a été attribuée à l'activation ou l'interférence avec des voies de signalisation telle que celle des MAPK (Pruzzo *et al.*, 2005; Canesi *et al.*, 2005; Travers *et al.*, 2009). En effet, une étude des réponses des hémocytes de *Mytilus* exposés à des *V. splendidus* LGP32 morts par la chaleur renforce l'existence d'interactions spécifiques entre les hémocytes de moules et *V. splendidus* LGP32 et suggère que cette souche de *Vibrio* affecte les hémocytes des bivalves à travers une dérégulation du système immunitaire de signalisation (phosphorylation des p38 MAPK et PKC) (Ciacci *et al.*, 2010). En ce qui concerne la souche 7SHRW, il est possible que les bactéries ne soient pas reconnues par les hémocytes des moules. Dans ce cas les réactions de défense de l'hôte contre les bactéries de cette souche ne sont pas déclenchées, ou plus tard lorsque la concentration bactérienne est augmentée. Ou alors, plus probablement, il est possible que les bactéries 7SHRW

ne soient pas capables de moduler les réponses immunitaires des mollusques ; il n'y a donc pas de dérèglement du système immunitaire en présence de cette souche.

Une façon d'explorer les différences de pathogénicité entre les souches de *V. splendidus* LGP32 et 7SHRW serait de comparer les séquences de leurs génomes et d'explorer des mutations pertinentes de gènes candidats. Plus particulièrement, étant donné que la virulence de LGP32 chez les huîtres a principalement été attribuée à la protéine externe de membrane OmpU, il pourrait être intéressant de déterminer le statut d'OmpU chez *V. splendidus* 7SHRW.

V.3 Conclusion et perspectives globales

Nous avons mis en place un modèle *in vitro* d'interactions hémocytes-bactéries en exposant les hémocytes de *M. edulis* à différentes souches de *V. splendidus* pendant 0, 2, 4 et 6 heures. La cinétique des réponses immunitaires morphologiques (non-adhérences des hémocytes), fonctionnelles (activités phagocytaires et activation du stress oxydant) et moléculaires au cours de l'infection bactérienne a été étudiée. La souche LGP32 induit les réponses les plus rapides et les plus fortes. Cette souche bactérienne semble avoir la capacité à moduler le système immunitaire des moules. Une des priorités pour répondre à nos différentes hypothèses est d'étudier si LGP32 est viable et se développe dans les hémocytes. La souche 7SHRW pourrait, quant à elle, servir de contrôle négatif de pathogénicité. Aussi, des acteurs moléculaires clés de la réponse immunitaire des hémocytes de *M. edulis* exposés à *V. splendidus* LGP32 ont été identifiés. Globalement, ils sont impliqués dans la voie des récepteurs Toll, dans la signalisation cellulaire, dans les processus d'adhésion des cellules, de phagocytose, de stress oxydant et de l'apoptose. Il serait intéressant d'explorer ces différents processus plus en détails en réponse à l'infection bactérienne. Des études protéomiques pourraient également être envisagées afin d'étudier la régulation des protéines en réponse à l'infection.

Associé avec les résultats du projet global, ce travail peut permettre de créer des outils de diagnostic de l'immunocompétence pour des programmes de suivi de la santé de *M. edulis* d'importance économique ou de suivi de la qualité de l'environnement. Les connaissances acquises sur cette espèce à titre de « modèle biologique » pourront également contribuer à l'étude des mécanismes d'infection par des bactéries, des protistes ou de virus responsables de maladies chez les bivalves d'importance commerciale. Elles pourront ainsi conduire à des recommandations pour l'industrie conchylicole afin de permettre l'instauration de programmes de sélection de souches plus résistantes aux maladies ou encore pour préconiser des pratiques zootechniques capables de limiter les facteurs de stress défavorables à la condition de l'espèce cultivée.

Références Bibliographiques

(hors références des publications)

- A -

- Adema C.M., Hanington P.C., Lun C.M., Rosenberg G.H., Aragon A.D., Stout B.A., Lennard Richard M.L., Gross P.S., Loker E.S., 2010. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraense* (Digenea, Platyhelminthes), *Molecular Immunology*, **47**: 849-860.
- Adema C.M., Hertel L.A., Miller R.D., Loker E.S., 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 8691-8696.
- Ahrendt H.Y., Halachmi S., Chow J.T., Wu L., Halachmi N., Yang S.C., Wehage S., Jen J., Sidransky D., 1999. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (13): 7382-7387.
- Akaishi F.M., St-Jean S.D., Bishay F., Clarke J., Rabitto I. da S., de Oliveira Ribeiro C.A., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater, *Aquatic Toxicology*, **82**: 1-14.
- Aladaileh S., Nair S.V., Birch D., Raftos D.A., 2007a. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) haemocytes: morphology and function, *Journal of invertebrates Pathology*, **96**: 48-63.
- Aladaileh S., Nair S.V., Raftos D.A., 2007b. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns, *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 1196-1208.
- Aladaileh S., Rodney P., Nair S.V., Raftos D.A., 2007c. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **148B**: 470-480.
- Allam B., Ford S., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge, *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 374-383.
- Allam B., Paillard C., Auffret M., Ford S., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge, *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 384-397.
- Allam B., Ashton-Alcox K.A., Ford S.E., 2002. Flow cytometric comparison of hemocytes from three species of bivalve molluscs, *Fish & Shellfish Immunology*, **13**: 141-158.
- Allam B., Ashton-Alcox K.A., Ford S.E., 2001. Hemocytes activities associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* species clams, *Developmental & Comparative Immunology*, **25**: 365-375.

- Allam B., Paillard C. Auffret M., 2000. Alterations in haemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*, *Journal of Invertebrates Pathology*, **76**: 63-69.
- Araya M.T., Markham F., Mateo D.R., McKenna P., Johnson G.R., Berthe F.J.C., Siah A., 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*, *Fish & Shellfish Immunology*, **29**: 557-64.
- Araya M.T., Siah A., Mateo D.R., Markham F., McKenna P., Johnson G.R., Berthe F.C.J., 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*, *Journal of Shellfish Research*, **28** (4): 751-758.
- Armstrong P., Quigley J., 1992. Humoral immunity: α -macroglobulin activity in the plasma of mollusks, *The Veliger*, **35**: 161-164.
- Arumugam M., Romestand B., Torreilles J., Roch P., 2000. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis, *European Journal of Cell Biology*, **79**: 513-519.
- Asokan R., Arumugam M., Mullainadhan P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus, *Developmental and Comparative Immunology*, **21**: 1-12.
- Aucoin F., Doiron S., Nadeau M., 2003. Guide d'échantillonnages et d'identification des larves d'espèces à intérêt maricole, *Guide Publication G005*, 1-81.
- Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**: 393-405.
- Auffret M., 1988. Bivalve hemocyte morphology, *American Fisheries Society Special Publication*, **18**: 169-177.
- Austin B., 2006a. *Vibrio salmonicida*. In: The biology of Vibrios. Thompson F.L. (ed.) ASM Press, Washington D.C. pp. 281-284.
- Austin B., 2006b. Miscellaneous animal pathogens. In: The biology of Vibrios. Thompson F.L. (ed.) ASM Press, Washington D.C. pp. 297-308.
- Austin B., Zhang X-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates, *Letters in Applied Microbiology*, **43**: 119-124.

- B -

- Bachali S., Jarger M., Hassanin A., Schoentgen F., Jollès P., Fiala-Medioni A., Deutsch J.S., 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function, *Journal of Molecular Biology*, **54**: 652-664.

- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*, *Immunological Reviews*, **198**: 652-664.
- Ballarin L., Scanferla M., Cima F., Sabbadin A., 2002. Phagocyte spreading and phagocytosis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*: evidence for an integrin-like, RGD-dependent recognition mechanism, *Developmental and Comparative Immunology*, **26**(4): 345-354.
- Balseiro P., Falcó A., Romero A., Dios S., Martínez-López A., Figueras A., Estepa A., Novoa B., 2011. *Mytilus galloprovincialis* Myticin C: A Chemotactic Molecule with Antiviral Activity and Immunoregulatory Properties, *PLoS ONE*, **6** (8): e23140.
- Barcia R., Cao A., Arbeter J., Ramos-Martinez J.I., 1999. The II-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk, *IUBMB Life*, **48**: 419-423.
- Barczyk M., Carracedo S. and Gullberg D., 2010. Integrins, *Cell and Tissue Research*, **339**(1): 269-280.
- Bard J.B.L., Rhee S.Y., 2004. Ontologies in biology: design, applications and future challenges, *Nature Reviews*, **5**: 213-222.
- Bayne B.L., Newell R., 1983. Physiological energetics of marine molluscs, 407-515. In: The Mollusca A. S. M. Saleuddin and K. M. Willow (ed.), V. 4, Part 1. Academic.
- Bayne B.L., Widdows J., Newell R.I.E., 1977. Physiological measurements on estuarine bivalve molluscs in the field. In Biology of benthic organisms (11th European Symposium on Marine Biology, Galway), B.F. Keegan, Ceidigh P.O, Boaden P.J.S. (ed.), pp.57-68.
- Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P., Smith G. P., Milton J., Brown C. G., Hall K. P., Evers D. J., Barnes C. L., Bignell H. R., Boutell J. M., Bryant J., Carter R. J., Keira Cheetham R., Cox A. J., Ellis D. J., Flatbush M. R., Gormley N. A., Humphray S. J., Irving L. J., Karbelashvili M. S., Kirk S. M., Li H., Liu X., Maisinger K. S., Murray L. J., Obradovic B., Ost T., Parkinson M. L., Pratt M. R., et al., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry, *Nature*, **456**: 53-59.
- Bettencourt R., Pinheiro M., Egas C., Gomes P., Afonso M., Shank T., Santos R.S., 2010. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*, *BMC Genomics*, **11**:559.
- Bettencourt R., Dando P., Collins P., Costa V., Allam B., Serrão Santos R., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, A **152**: 278-289.
- Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Canonico B., Falcioni T., Gallo G., Canesi L., 2006. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on *Mytilus* haemocytes: role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs), *Biology of the Cell*, **98**: 233-244.
- Bierman J., MacInnis A.J., Lobstein O.E., 1979. Effects of lysozyme on *Trypanosoma lewisi*, *Annual Clinical Lab*, **9**: 381-386.

- Bilbao E., Cajaraville M.P., Cancio I., 2009. Cloning and expression pattern of peroxisomal beta-oxidation genes palmitoyl-CoA oxidase multifunctional protein and 3-ketoacyl-CoA thiolase in mussel *Mytilus galloprovincialis* and thicklip grey mullet *Chelon labrosus*, *Gene*, **443** (1-2):132-42.
- Binese J., Delsert C., Saulnier D., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M., Munier-Lehmann H, Mazel D., Le Roux F., 2008. Metalloprotease *vsm* is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 7108-7117.
- Bohlson S.S., Fraser D.A., Tenner A.J., 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions, *Molecular Immunology*, **44** (1-3):33-43.
- Bonami J.R., Lightner D.V., 1991. Unclassified viruses of crustacean. In: J.R. Adams and J.R. Bonami (Eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 597-622.
- Borrego J.J., Luque A., Castro D., Santamaria J.A., Martinez-Manzares E., 1996. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, *Aquatic Living Resources*, **9**: 125-136.
- Boshra H., Li J., Sunyer J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish, *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 239-262.
- Boutet I., Tanguy A., Le Guen D., Piccino P., Hourdez S., Legendre P., Jollivet D., 2009. Global depression in gene expression as a response to rapid thermal changes in vent mussels, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, **276**: 3071-3079.
- Boutet I., Tanguy A., Moraga D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions, *Gene*, **329**: 147-157.
- Boutet I., Tanguy A., Rousseau S., Auffret M., Moraga D., 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Cell Stress & Chaperone*, **8**: 76-85.
- Bramble L.H., Anderson R.S., 1998. A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*, *Developmental and Comparative Immunology*, **22**: 55-61.
- Breton S., Doucet Beaupre H., Stewart D.T., Hoeh W.R., Blier P.U., 2007. Review: The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?, *Trends in Genetics*, **23** (9) : 465-474.
- Brew K., Dinakarbandian D., Nagase H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**: 267-283.
- Brown K., Hancock R., 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptide, *Current Opinion in Immunology*, **18**: 24-30.
- Buggé, D.A., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes, *Fish & Shellfish Immunology* **23**: 188-196.

- Burge C.A., Griffin F.J., Friedman C.S., 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA, *Diseases of Aquatic Organisms*, **72**: 31-43.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Plaffl M.W., 2005. Review: Quantitative real-time RT-PCR- a perspective, *Journal of Molecular Endocrinology*, **3**: 597-601.

- C -

- Cai J., Li J., Thompson K.D., Li C., Han H., 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor* supertexta, *Journal of Basic Microbiology*, **47**: 84-86.
- Canesi L., Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Pruzzo C., Gallo G., 2006. Cell signaling in the immune response of mussel hemocytes, *Invertebrate Survival Journal*, **3**: 40-49.
- Canesi L., Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Gallo G., Pruzzo C., 2005. Interactions between *Mytilus* haemocytes and different strains of *Eschericia coli* and *Vibrio cholera* O1 El Tor: role of kinase-mediated signaling, *Cellular Microbiology*, **7**: 667-674.
- Canesi, L., Gavioli M., Pruzzo C., Gallo G., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves, *Microscopy Research and Technique*, **57**: 469-476.
- Cao A., Ramos J.A., Barcia R., 2004. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. By LPS and IL-2, *Molecular Immunology*, **41**: 45-52.
- Cao A., Mercado L., Ramos-Martinez J.I., Barcia R., 2003. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk: expression of IL-2R α subunit, *Aquaculture*, **216**: 1-8.
- Carballal M.J., López C., Azevedo C., Villalba A., 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, **70**: 96-105.
- Carjaraville M.P., Pal S.G., 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment, *Cell Structure and Functions*, **20**: 355-367.
- Cattoir V., Poirel L., Mazel D., Soussy C.J., Nordmann P., 2007. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 2650-2651.
- Cellura C., Toubiana M., Parrinello N., Roch P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels, *Fish & Shellfish Immunology*, **22**: 340-350.
- Cellura C., Toubiana M., Parrinello N., Roch P., 2006. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*, *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 984-997.

- Cerenius L., Söderhäll K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates, *Immunological Reviews*, **198**: 116-126.
- Chakraborty S., Nair G.N., Shinoda S., 1997. Pathogenic *Vibrios* in the natural aquatic environment, *Reviews on Environmental Health*, **12**: 63-80.
- Champeau O., 2005. Thèse : Biomarqueur d'effets chez *C. fluminea* : développement en laboratoire à l'application en mésocosme, Université de Bordeaux I, 281 pages.
- Chang S-J., Tseng S-M., Chou H-Y., 2005. Morphological characterization via light and electron microscopy of the haemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *Zoological Studies*, **44**: 144-153.
- Chen J., Xiao S., Yu Z., 2011. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*), *Fish & Shellfish Immunology*, **30**(2): 750-754.
- Cheney D.P., MacDonald B.F., Elston R.A., 2000. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, *Journal of shellfish research*, **19**: 353-359.
- Cheng T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Recent Advances in Marine Biotechnology. Vol.5 Immunology and Pathology. Fingerman M. & Nagabhusanam (eds) Sciences Publishers Inc. Enfield, p43-83.
- Cheng T.C., 1984. A classification of molluscan haemocytes based on functional evidence. In: Bulla L.A., Cheng T.C. (eds) Comparative Pathobiology. Vol. 6, New York: Plenum Press, p. 111-146.
- Cheng T.C., 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation, *American Zoologist*, **23**: 129-144.
- Cheng T.C., 1981. Bivalves. In: N.A. Ratcliffe. A.F. Rowley (eds). Invertebrate blood cells. Vol. I. London, Academic Press, pp. 233-300.
- Cheng T.C., Rodrick G.E., 1975. Lysosomal and other enzymes in the haemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **52B**: 443-447.
- Cheng T.C., Rodrick G.E., 1974. Identification and characterization of lysozyme from the haemolymph of the soft-shell clam, *Mya arenaria*, *The Biological Bulletin*, **147**: 311-320.
- Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J.A., Bulet P., 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*, *The Journal of Biochemical Chemistry*, **271**: 21808-21813.
- Cho J.C., Tedje J.M., 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays, *Applied and environmental microbiology*, **67**(8): 3677-3682.
- Choquet G., Soudab P., Lambert C., Nicolas J-L., Paillard C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* haemocytes exposed to *Vibrio tapetis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**: 109-116.

- Ciacci C., Betti M., Canonico B., Citterio B., Roch P., Canesi L., 2010. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**: 49-55.
- Ciacci C., Citterio B., Betti M., Canonico B., Roch P., Canesi L., 2009. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **153B**: 365–371.
- Cima F., Matozzo V., Marin M.G., Ballarin L., 2000. Hemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): Morphofunctional characterization, *Fish & Shellfish Immunology*, **10**: 677-693.
- Clark M.S., Thorne M.A.S., Vieira F.A., Cardose J.C.R., Power D.M., Peck L.S., 2010. Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing, *BMC Genomics*, **11**:362.
- Cloonan N., Forrest A.R.R., Kolle G., Gardiner B.B.A., Faulkner G.J., Brown M.K., Taylor D.F., Steptoe A.L., Wani S., Bethel G., Robertson A.J., Perkins A.C., Bruce S.J., Lee C.C., Ranade S.S., Peckham H.E., Manning J.M., McKernan K.J., Grimmond S.M., 2008. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing, *Nature Methods*, **5**: 613–619.
- Cohen M.C., Cohen S., 1996. Cytokine function: a study in biologic diversity, *American Journal of Clinical Pathology*, **105**: 589-598.
- Coles J.A., Pipe R.K., 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*, *Fish & Shellfish Immunology*, **4**: 337-352.
- Comesaña A.S., Toro J.E., Innes D.J., Thompson R.J., 1999. A molecular approach to the ecology of a mussel (*Mytilus edulis* - *M. trossulus*) hybrid zone on the east coast of Newfoundland, Canada, *Marine Biology*, **133**: 213-221.
- Cong R., Sun W., Liu G., Fan T., Meng X., Yang L., Zhu L., 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, **18**: 61-70.
- Costa M.M., Prado-Alvarez M., Gestal C., Li H., Roch P., Novoa B., Figueras A., 2009a. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen associated molecular patterns and bacteria, *Fish & Shellfish Immunology*, **26**: 515-523.
- Costa M.M., Dios S., Alonso-Gutierrez J., Romero A., Novoa B., Figueras A., 2009b. Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*), *Developmental and Comparative Immunology*, **33**: 162-170.
- Cotter P.A., DiRita V.J., 2000. Bacterial virulence gene regulation: An evolutionary perspective, *Annual Review of Microbiology*, **54**: 519-565.
- Craft J.A., Gilbert J.A., Temperton B., Dempsey K.E., Ashelford K., Tiwari B., Hutchinson T.H., Chipman J.K., 2010. Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-Specific Expression Patterns. *PLoS ONE*, **5**(1): e8875.

- Cronin M.A., Culloty S.C., Mulcahy M.F., 2001. Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.), *Fish & Shellfish Immunology*, **11**: 611-622.
- Crosa J.H., Actis L.A., Tolmasky M.E., 2006. The biology and pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. In: The biology of Vibrios. Thompson F.L. (ed.) ASM Press, Washington D.C. pp. 251-265.
- Cowan K.J., Storey K.B., 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress, *The Journal of Experimental Biology*, **206**: 1107-1115.
- Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J., 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity, *Immunological Reviews*, **193**: 10-21.

- D -

- Daguin C., Bonhomme F., Borsa P., 2001. The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1, *Heredity*, **86**: 342-354.
- Daines B., Wang H., Wang L., Li Y., Han Y., Emmert D., Gelbart W., Wang X., Li W., Gibbs R., Chen R., 2011. The *Drosophila melanogaster* transcriptome by paired-end RNA sequencing, *Genome Research*, **21** (2): 315-324.
- Davids B.J., Yoshino T.P., 1998. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes, *Developmental and Comparative Immunology*, **22**(1): 39-53.
- Delgado M., Singh S., De Haro S., Master S., Ponpuak M., Dinkins C., Ornatowski W., Vergne I., Deretic V., 2009. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity, *Immunological Reviews*, **227**: 189-202.
- Dell'Angelica E.C., Mullins C., Caplan S., Bonifacino J.S., 2000. Lysosome-related organelles, *The FASEB Journal*, **14**: 1265-1278.
- de Lorgeril J., Zenagui R., Rosa R.D., Piquemal D., Bachère E., 2011. Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression Analysis, *PLoS ONE*, **6** (8): e23142.
- Deraison Manuel C., 2002. Isolement, caractérisation et cibles de nouveaux inhibiteurs de protéases pour la création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Thèse Université Paris IX-UFR scientifique d'Orsay, 241 pages.
- Deretic V., Levine B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations, *Cell Host & Microbe*, **5**(6): 527-549.
- De Zoysa M., Whang I., Nikapitiya C., Oh C., Cheol Y.C., Lee J., 2011. Transcriptional analysis of disk abalone (*Haliotis discus discus*) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge, *Fish & Shellfish Immunology*, **31**: 155-160.
- Dheda K., Higgett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *BioTechniques*, **37**: 112-119.

- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 6025-6030.
- Dondero F., Piacentini L., Marsano F., Rebelo M., Vergani L., Venier P., Viarengo A., 2006. Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray, *Gene*, **376**(1): 24-36.
- Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, **82**: 47-95.
- Dryselius R., Kurokawa K., Iida T., 2007. *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Research in Microbiology*, **158**: 479-86.
- Duperron, 2005. Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux sources de fluides en domaine océanique profond : diversité, rôle nutritionnel et influence de l'environnement. These, Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France, 226p.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgetil, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., Destournieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**: 2993–2998.
- Duperthuy M., Binesse J., Le Roux F., Romestand B., Caro A., Got P., Givaudan A., Mazel D., Bachère E., Destournieux-Garzón D., 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*, *Environmental Microbiology*, **12**: 951-963.

- E -

- Edwards C.A., Skibinski D.O., 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*M. edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales, *Marine Biology*, **94**: 547-556.
- Elsayed E., McLaughlin S., Faisal M., 1999. Protease inhibitors in plasma of the softshell clam *Mya arenaria*: identification and effects of disseminated sarcoma, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **123B**: 427-435.
- Eck S. H., Benet-Pages A., Flisikowski K., Meitinger T., Fries R., Strom T. M., 2009. Whole genome sequencing of a single *Bos taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery, *Genome Biology*, **10**:R82.
- Eckert R., Randall D., Burggren W., French K., 1999. Physiologie animale, mécanismes et adaptations, Traduction par Matt F., avec la collaboration de Propper A., Henquell L.. Eds De Boeck Université s.a. 800 pages.
- Eikhom T.S., Abraham K.A., Dowben R.M., 1975. Ribosomal RNA metabolism in synchronized plasmacytoma cells. *Experimental Cell Research*, **91**(2): 301–309.

Emeny R.T., Marusov G., Lawrence D.A., Pederson-Lane J., Yin X., Lynes M.A., 2009. Manipulations of metallothionein gene dose accelerate the response to *Listeria monocytogenes*, *Chemico-Biological Interactions*, 181: 243-253.

- F -

Faherty C.S., Maurelli A.T., 2008. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection, *Trends in Microbiology*, 16(4): 173-180.

Faisal M., MacIntyre E., Adham K., Tall B., Kothary M., La Peyre J., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121B: 161-168.

FAO : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis

FAO, 2008. The state of World Fisheries and Aquaculture, SOFIA. Disponible sur <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>.

Farmer, J. J., III & Hickman-Brenner, F. W., 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 6, pp. 508–563. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Farmer J.J., Janda M., Brenner F.W., Cameron D.N., Birkhead K.M., 2005. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 2nd Edition. The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds), *Bergey's Manual Trust*. Pp. 494-546.

Farrer R. A., Kemen E., Jones J. D. G., Studholme D. J., 2009. *De novo* assembly of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a genome using Illumina/Solexa short sequence reads, *FEMS Microbiology Letters*, 291: 103–111.

Farto R., Armanda S.P., Montes M., Perez M.J., Nieto T.P., 2006. Presence of a lethal protease in the extracellular products of *Vibrio splendidus*-*Vibrio lentus* related strains, *Journal of Fish Diseases*, 29: 701-707.

Feder M., Hofmann G., 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annual Reviews of Physiology*, 61: 243-282.

Feng S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels, *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 153-168.

Flannagan R.S., Cosio G., Grinstein S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies, *Nature Reviews Microbiology*, 7(5): 355-66.

Flegel T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods, *Developmental & Comparative Immunology*, 31: 217-231.

- Flegel T.W., Pasharawipas T., 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: T.W. Flegel, Editor, Advances in shrimp biotechnology, *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok, 245-250.
- Fleury E., Moal J., Boulo V., Daniel J.Y., Mazurais D., Hénaut A., 2009. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific Oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality, *Marine Biotechnology*, **12**: 326-339.
- Franzellitti S., Fabri E., 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**: 1157-1163.
- Freeman W.M., Robertson D.J., Vrana K.E., 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis, *Biotechniques*, **29**, 1042-1055.
- Friebel B., Renwrandt L., 1995. Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **112A** (1): 81-90.
- Friedman C.S., Cloney D.F., Manzer D., Hedrick R.P., 1991. Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Journal of Invertebrates Pathology*, **58** (3): 367-372.
- Fu Y, Xie L, Zhang R (2008) Cloning and characterization of 37 kDa laminin receptor precursor in pearl oyster, *Pinctada fucata*, *Progress in Natural Science*, **18**: 233-238.
- Fulda S., Gorman A.M., Hori O., Samali A., 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death, *International Journal of Cell Biology*, Article ID 214074, 23 pages.

- G -

- Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T., 2006. Effects of temperature and salinity on hemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 536-547.
- Gagné F., Blaise C., Pellerin J., Fournier M., 2009. Etudes de biomarqueurs chez la mye commune (*Mya arenaria*) du fjord du Saguenay : bilan de recherches (1997 à 2006), *Revue des Sciences de l'eau, numero thématique*, **22**(2), 253-269.
- Galloway T.S., Depledge M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance, *Ecotoxicology*, **10**: 5-23.
- García-García E., Prado-Álvarez M., Novoa B., Figueras A., Rosales C., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families, *Developmental and Comparative Immunology*, **32**: 637-653.
- Gardner J.P.A., 1996. The *Mytilus edulis* species complex in southwest England: the extent of hybridization and introgression and their effects upon interlocus associations and morphometric variation, *Marine Biology*, **125**: 385-399.

- Gardner J.P.A., 1994. The structure and dynamics of naturally occurring hybrid *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 and *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia, Mollusca) populations: review and interpretation, *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*, **99**: 37-71.
- Gatesoupe F.J., Lambert C., Nicolas J.L., 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, *Journal of Applied Microbiology*, **87**: 757-763.
- Gay M., Berthe F., Le Roux F., 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**: 49-56.
- Gay M., Berthe F., Le Roux F., 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations, *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**: 49-56.
- Gerdol M., Manfrin C., De Moro G., Figueras A., Novoa B., Venier P., Pallavicini A., 2011. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules, *Developmental and Comparative Immunology*, **35**: 635-643.
- Gestal C., Pallavicini A., Venier P., Novoa B., Figueras A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*, *Developmental and Comparative Immunology*, **34**: 926-934.
- Gestal C., Roch P., Renault T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Oubella R., Venier P., Figueras A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics, *Reviews in Fisheries Science*, **16**(1): 133-156.
- Gestal C., Costa M., Figueras A., Novoa B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacteria stimulation in haemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides, *Gene*, **406**: 134-143.
- Gilman A.G., 1995. G proteins and regulation of adenylyl cyclase, *Bioscience Reports*, **15**: 65-97.
- Gómez-León J., Villamil L., Lemos M.L., Novoa B., Figueras A., 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet Shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 98-104.
- Goncalves A., Tikhonov A., Brazma A., Kapushesky M., 2011. A pipeline for RNA-seq data processing and quality assessment, *Bioinformatics Advance Access*, 1-3.
- Gorbushin A.M., Iakovleva N.V., 2011. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*, *Fish & Shellfish Immunology*, **30**(1): 434-438.
- Gosling E., 1992. The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Amsterdam, Holland: Elsevier.
- Gourdon I., Guérin M.C., Torreilles J., Roch P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **5**: 1-6.
- Green C.D., Simons J.F., Taillon B.E., Lewin D.A., 2001. Open systems: panoramic views of gene expression, *Journal of Immunological Methods*, **250**: 67-79.

- Green T.J., Barnes A.C., 2009. Inhibitor of REL/NF- κ B is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible, *Fish & Shellfish Immunology*, **27**: 260-265.
- Guéguen Y., Bernard R., Julie F., Paulina S., Destoumieux-Garzón D., Vandenbilcke F., Bulet P., Bachère E., 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin, *Molecular Immunology*, **46**: 516-522.
- Guéguen Y., Herpin A., Aumelas A., Garnier J., Fievet J., Escoubas J-M., Bulet P., Gonzales M., Lelong C., Favrel P., Bachère E., 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, holding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 313-323.
- Guéguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumiguière C., Giradot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from haemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*, *Gene*, **303**: 139-145.
- Gurskaya N.G., Diatchenko L., Chenchik A., 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate, *Analytical biochemistry*, **240**: 90-97.

- H -

- Hacia, 1999. Review: Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays, *Nature genetics supplement*, **21**: 42-47.
- Hancock R., Rozek A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides, *FEMS Microbiology Letters*, **206**: 143-149.
- Hariharan H., Giles J.S., Heany S.B., Arsenault G., Mc Nair N., Rainnie D.J., 1995. Bacteriological studies on mussels and oysters from six river systems in Prince Edward Island, Canada. *Journal of Shellfish Research*, **14** (2): 527-532.
- Häse C.C., Finkelstein R.A., 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases, *Microbiological Reviews*, **57**(4): 823-837.
- Hasegawa H., Gharaibeh D.N., Lind E.J., Häse C.C., 2009. Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae, *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**: 4101-4110.
- Hasegawa H., Lind E.J., Boin M.A., Häse C., 2008. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for oyster *Crassostrea gigas* larvae, *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**: 123-131.
- Hauton C. Hawkins L.E., Hutchinson S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **127**: 203-212.

- Hégaret H., Wikfors G.H., 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*, *Harmful Algae*, **4**: 187-199.
- Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P., 2003a. Flow cytometric analysis of hemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Hemocyte types and morphology, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **293**: 237-248.
- Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P., 2003b. Flow cytometric analysis of hemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Hemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis and respiratory burst, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **293**: 249-265.
- Hellio C., Bado-Nilles A., gaignaire B., Renault T., Thomas-Guyon H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPo cascade in Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*, *Fish & Shellfish Immunology*, **22**: 433-440.
- Hilbish T.J., Mullinax S.I., Dolven S.I., Meyer A.K., Rawson P.D., 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussel (*Mytilus spp.*): routes and timing of transequatorial migration, *Marine Biology*, **136**: 69-77.
- Hilbish T.J., Bayne B.L., Day A., 1994. Genetics of physiological differentiation with the marine mussel genus *Mytilus*, *Evolution*, **48**: 267-286.
- Hine P.M., 1999. The inter-relationship of bivalve haemocytes, *Fish & Shellfish Immunology*, **9**: 367-385.
- Hoarau P., Damiens G., Roméo M., Gnassia-Barelli M., Bebianno M.J., 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution, *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C: Toxicology & Pharmacology*, **143**(2): 196-203.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.B., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science*, **284**: 1313-1318.
- Hou R., Bao Z., Wang S., Su H., Li Y., Du H., Hu J., Wang S., Hu X., 2011. Transcriptome Sequencing and *De Novo* Analysis for Yesso Scallop (*Patinopecten yessoensis*) Using 454 GS FLX, *PLoS ONE*, **6** (6): e21560.
- Huan P., Wang H., Baozhong L., 2012. Transcriptomic Analysis of the Clam *Meretrix meretrix* on Different Larval Stages, *Marine Biotechnology*, **14**: 69-78.
- Hubert F., Noel T., Roch P., 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), *European Journal of Biochemistry*, **240**(1): 302-306.
- Huffman J.E., Tripp M.R., 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) haemocytes, *Journal of Invertebrate Pathology*, **40**: 68-74.
- Hughes T.K., Smith E.M., Barnett J.A., Charles R., Stefano G.B., 1991. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1, *Developmental and Comparative Immunology*, **15**: 117-122.

- Hughes T.K., Smith E.M., Chin R., Cadet P., Sinisterra J., Leung M., Shipp M.A., Scharrer B., Stefano G.B., 1990. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*, *Proceedings of the National Academy of Science*, **87**: 4426-4429.
- Huq A., Colwell R.R., 1995. Vibrios in the marine and estuarine environments, *Journal of Marine Biotechnology*, **3**: 60-63.
- Huvet A., Herpin A., Dégremont L., Labreuche Y., Samain J-F., Cunningham C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality, *Gene*, **343**: 211-220.

- I -

- Imler J.L., 2004. Immunité innée et récepteurs Toll, Flammarion Médecine-Science – Actualités néphrologiques (www.medecine.flammarion.com).
- Ireland H.E., Leoni F., Altaie O., Birch C.S., Coleman R.C., Hunter-Lavin C., Williams J.H.H., 2007. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells, *Methods*, **43**: 176-183.
- Itoh N., Takahashi K.G., 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **150**: 409-417.
- Itoh N., Takahashi K.G., 2007. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **148B**: 160-166.
- Itoh N., Xue Q-G., Li Y., Cooper R.K., La Peyre J.F., 2007. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 957-968.
- Iwanaga S., Lee B.L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**: 128-150.

- J -

- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J., 2005. Immunobiology: the immune system in health and disease (6th ed.), Garland Science Publishing, New York and London.
- Janeway C.A., Medzhitov R., 2002. Innate immune recognition, *Annual Review of Immunology*, **20**: 197-216.
- Janeway C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **54**: 1-13.
- Jensen S., Samuelsen O.B., Andersen K., Torkildsen L., Lambert C., Choquet G., Paillard C., Bergh ø., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis, *Diseases of Aquatic Organisms*, **53**: 25-31.

- Jeukens J., Renaut S., St-Cyr J., Nolte A.W., Bernatchez L., 2010. The transcriptomics of sympatric dwarf and normal lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* spp., Salmonidae) divergence as revealed by next-generation sequencing, *Molecular Ecology*, **19** (24): 5389-5403.
- Jing X., Pales Espinosa E., Perrigault M., Allam B., 2011. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *Fish & Shellfish Immunology*, **30**: 851-858.
- Johannesson K., Kautsky N., Tedengren M., 1990. Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. II. Genetic variation, *Marine Ecology Progress Series*, **59**: 211-219.
- Johansson M.W., Soderhall K., 1989. A Peptide Containing the Cell-Adhesion Sequence Rgd Can Mediate De-Granulation and Cell-Adhesion of Crayfish Granular Hemocytes In vitro, *Insect Biochemistry*, **19**(6): 573-579.
- Jollès P., Jollès J., 1984. What's new in lysozyme research ?, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **63**: 165-189.
- Jones S., Howell T.L., O'Neill K.R., 1991. Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio* sp. from oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1971) in a commercial controllers purification facility in Maine, *Journal of Shellfish Research*, **10**: 105-112.

- K -

- Kang Y-S., Kim Y-M., Park K-I., Choi S.K., Cho M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in haemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*, *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 1119-1131.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar A., Lategan M.J., Gibson L., 2009. Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate, *Journal of Fish Diseases*, **32**: 499-507.
- Kilpatrick D.C., 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1572**: 187-197.
- Kim J.-I., Ju Y. S., Park H., Kim S., Lee S., Yi J.-H., Mudge J., Miller N. A., Hong D., Bell C. J., Kim H.-S., Chung I.-S., Lee W.-C., Lee J.-S., Seo S.-H., Yun J.-Y., Woo H. N., Lee H., Suh D., Lee S., Kim H.-J., Yavartanoo M., Kwak M., Zheng Y., Lee M. K., Park H., Kim J. Y., Gokcumen O., Mills R. E., Zaranek A.W., Thakuria J., Wu X., Kim R.W., Huntley J.J., Luo S., Schroth G.P., Wu T.D., Kim H., et al., 2009. A highly annotated whole genome sequence of a Korean individual, *Nature*, **460**:1011-1015.
- Kim J.Y., Adhya M., Cho S.K., Choi K.S., Cho M., 2008. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*), *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 598-603.

- Kim K.Y., Lee S.Y., Cho Y.S., Bang I.C., Kim K.H., Kim D.S., Nam Y.K., 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*, *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 1043-1059.
- Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Dhruv A.K., Greenhough T.J., Reid K.B., Sim R.B., Arlaud G.J., 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility, *Trends in Immunology*, **25**: 551-561.
- Kishore U., Reid K.B., 2000. C1q: structure, function and receptors, *Immunopharmacology*, **42**: 15-21.
- Kiss T., 2010. Apoptosis and its functional significance in mollusks, *Apoptosis*, **15**: 313-321.
- Koehn R.K., 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*, *Aquaculture*, **94**: 125-145.
- Kolaiti R.M., Lucas J.M., Kouyanou-Koutsoukou S., 2009. Molecular cloning of the ribosomal P-proteins MgP1, MgP2, MgP0, and superoxide dismutase (SOD) in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and analysis of MgP0 at stress conditions, *Gene*, **430** (1-2):77-85.
- Kong P., Zhang H., Wang L., Zhou Z., Yang J., Zhang Y., Qiu L., Song L., 2010. AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop *Argopecten irradians* with fungi agglutinating activity, *Developmental and Comparative Immunology*, **34**: 837-846.
- Kornprobst J.M., 2005. Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies, *Tec & Doc Lavoisier*, Paris, 1834 pp.
- Kourtidis A., Drosopoulou E., Nikolaidis N., Hatzi V.I., Chintiroglou C.C., Scouras Z.G., 2006. Identification of Several Cytoplasmic HSP70 Genes from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Their Long-Term Evolution in Mollusca and Metazoa, *Journal of Molecular Evolution*, **62**: 446-459.
- Kudryashov D.S., Oztug Durer Z.A., A. Ytterberg A.J., Sawaya M.R., Pashkov I., Prochazkova K., Yeates T.O., Ogorzalek Loo R.R., Loo J.A., Fullner Satchell K.J., Reisler E., 2008. Connecting actin monomers by isopeptide bond is a toxicity mechanism of the *Vibrio cholerae* MARTX toxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(47): 18537-18542.

- L -

- Labreuche Y., Soudant P., Goncalves M., Lambert C., Nicolas J-L., 2006a. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental and Comparative Immunology*, **30**: 637-679.
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P., Buolo V., Huvet A., Nicolas J-L., 2006b. Cellular and molecular hemocyte response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32, *Microbes and Infection*, **8**: 2715-2724.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S. K., Cuff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M., Poulet S.A., 2001a. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France), *Disease of Aquatic Organisms*, **46**(2): 139-45.

- Lacoste A., Jalabert F., Malham S.K., Cueff A., Poulet S.A., 2001b. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2304-2309.
- Laing R., Hunt M., Protasio A.V., Saunders G., Mungall K., Laing S., Jackson F., Quail M., Beech R., Berriman M., Gilleard J.S., 2011. Annotation of two large contiguous regions from the *Haemonchus contortus* genome using RNA-seq and comparative analysis with *Caenorhabditis elegans*, *PLoS ONE*, **6** (8): e23216.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V., Corre S., 1998. *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**: 481-487.
- Lambert C., Nicolas J.-L., Bultel V., 2001. Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract, *Journal of Invertebrate Pathology*, **77**: 165-172.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios, *Fish & Shellfish Immunology*, **15**: 225-240.
- Lamoril J., Ameziame N., Deybach J.C., Bouizegarène P., Bogard M., 2008. DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one., *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, **23**: 260-279.
- Lane E., Birkbeck H., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes, *Journal of Fish Diseases*, **23**: 275-279.
- Lane E., Birkbeck T.H., 1999. Toxicity of bacteria toward hemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Living Resources*, **12**: 343-350.
- Lang R.P., Bayne C.J., Camara M.D., Cunningham C., Jenny M.J., Langdon C.J., 2009. Transcriptome profiling of selectivity bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock, *Marine Biotechnology*, **11** (5): 650-668.
- Le Crom S., 2005. Les techniques de criblage à grande échelle en génomique fonctionnelle : l'exemple des puces à ADN, ppt 34 pages.
- Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J., Dagher Z., Leboulenger F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging, *Fish & Shellfish Immunology*, **28**: 372-386.
- Lemaire N., Pellerin J., Fournier M., Girault L., Tamigneaux E., Carier S., Pelletier E., 2006. Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec, *Aquaculture*, **261**: 729-751.
- Le Roux F., Zouine M., Chakroun N., Binesse J., Saulnier D., Bouchier C., Zidane N., Ma L., Rusniok C., Lajus A., Buchrieser C., Médigue C., Polz M.F., Mazel D., 2009. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planktonic marine species with a large genotypic diversity, *Environmental Microbiology*, **11**(8): 1959-1970.

- Le Roux F., Binesse J., Saulnier D., Mazel D., 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 777-784.
- Le Roux F., Austin B., 2006. *Vibrio splendidus*. In: The biology of Vibrios. Thompson F.L. (ed), ASM Press, Washington D.C. pp. 285-296.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events, *Aquatic Living Resources*, **15** (4): 251-258.
- Li H., Parisi M-G., Toubiana M., Cammarata M., Roch P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses, *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 143-152.
- Li Q., Verma I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system, *Nature Reviews*, **2**: 725-734.
- Li R., Fan W., Tian G., Zhu H., He L., Cai J., Huang Q., Cai Q., Li B., Bai Y., Zhang Z., Zhang Y., Wang W., Li J., Wei F., Li H., Jian M., Li J., Zhang Z., Nielsen R., Li D., Gu W., Yang Z., Xuan Z., Ryder O.A., Leung F. C.-C., Zhou Y., Cao J., Sun X., Fu Y., Fang X., Guo X., Wang B., Hou R., Shen F., Mu B., Ni P., Lin R., Qian W., Wang G., Yu C., Nie W., Wang J., Wu Z., Liang H., Min J., Wu Q., Cheng S., et al. 2010. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome, *Nature*, **463**: 311-317.
- Li S., Strelow A., Fontana E.J., Wesche H., 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase, *PNAS*, **99**: 5567-5572.
- Liang P., Meade J.D., Pardee A.B., 2007. A protocol for differential display of mRNA expression using either fluorescent or radioactive labeling, *Nature protocols*, **3**: 457-470.
- Liang P., Pardee A.B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*, **5072**: 967-971.
- Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J., Gregory B.D., Berry C.C., Millar A.H., Ecker J.R., 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*, *Cell*, **133**: 523-536.
- Locke A., Hanson J., Ellis K., Thompson J., Rochette R., 2007. Invasion of the southern Gulf of St. Lawrence by the clubbed tunicate (*Styela clava* Herdman): Potential mechanisms for invasions of Prince Edward Island estuaries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **342**: 69-77.
- Lockhart D.J., Winzler E.A., 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature*, **405**: 827-836.
- Loup B., 2008. Etude des effets des contaminants chimiques de l'environnement chez les bivalves : approches de toxicogénomique fonctionnelle. Thèse LEMA - Université du Havre, 303 pages.
- Lubet P., 1980. Influence des facteurs externes sur la reproduction des Lamellibranches, *Océanis* **6**, **5**: 469-489.
- Luna-Acosta A., Saulnier D., Pommier M., Haffner P., De Decker S., Renault T., Thomas-Guyon H., 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes, *Fish & Shellfish Immunology*, **31**: 795-800.

Luna-Gonzales A., Maeda-Martinez A.N., Vargas-Albores F., Ascencio-Valle F., Robles-Mungaray M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs, *Fish & Shellfish Immunology*, **15**: 275-285.

- M -

Ma A.T., Mekalanos J.J., 2010. *In vivo* actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(9):4365-4370.

Mallet A.L., 1989. Culture of the mussel *Mytilus edulis*. In: Cold-Water aquaculture in Atlantic Canada, 179-210. Moncton: Canadian Institute for Research on Regional Development.

Marguerat S., Bähler J., 2010. Review: RNA-seq: from technology to biology, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**: 569–579.

Margulies M., Egholm m., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando C.S., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu K., Makhijani V.B., McDade K.E., et al., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature*, **437**: 376-380.

Mateo D.R., Greenwood S.J., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Siah A., 2010. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin 1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains, *Developmental and Comparative Immunology*, **34**: 710–714.

Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Greenwood S.J., 2009a. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence, *Journal of Invertebrate Pathology*, **102**: 50–56.

Mateo D.R., Spurmanis A., Siah A., Araya M.T., Kulka M., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Greenwood S.J., 2009b. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker, *Diseases of Aquatic Organisms*, **86**: 253-262.

Mateo D.R., 2006. Assessment of antimicrobial resistance in marine environments of Prince Edward Island using a selected bacterial group. MSc dissertation. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE, Canada.

Marques M.R.F., Barracco M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans, *Aquaculture*, **191**: 23-44.

Mathieu M., Dubois B., Costil K., Heude C., Huvet A., Kellner K., Pouvreau S, 2003. Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oysters in relation to physiological parameters, *The Journal of Shellfish Research*, **22**:343.

- Matozzo V., Marin M.G., Cima F., Ballarin L., 2008. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*, *Cell Biology International*, **32**: 865-868.
- Matsumoto T., Nakamura A.M., Takahashi K.G., 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oysters species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **145B**: 325-330.
- Maxam A. M., W. Gilbert, 1977. "A new method for sequencing DNA.", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **74** (2): 560-4.
- McDonald J.H., Seed R., Koehn R.K., 1991. Alloenzymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres, *Marine Biology*, **111**: 323-333.
- McHenery J.G., Birkbeck T.H., Allen J.A., 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **63B**: 25-28.
- Medizhitov R., Janeway C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system, *Science*, **296**(5566): 298-300.
- Milan M., Coppe A., Reinhardt R., Cancela L.M., Leite R.B., Saavedra C., Ciofi C., Chelazzi G., Patarnello T., Bortoluzzi S., Bargelloni L., 2011. Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring, *BMC Genomics*, **12**:234.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J.C., Salzet M., Roch P., 2000a. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel, *Journal of Cell Science*, **113**: 2759-2769.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P., 2000b. Minireview: Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity, *FEBS Letters*, **486**: 185-190.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P., 1999a. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge, *Journal of Cell Science*, **112**: 4233-4242.
- Mitta G., Hubert F., Noël T., Roch P., 1999b. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *European Journal of Biochemistry*, **265**(1):71-78.
- Mix M.C., 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks, *Marine Fisheries Review*, 37-41.
- Miyazaki T., Naoki N., Kobayashi T., 2000. Clinical trial results on the use of a recombinant feline interferon- γ to protect Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii* from akoya-virus infection, *Diseases of Aquatic Organisms*, **43**: 15-26.
- Miyoshi S., 2006. *Vibrio vulnificus* infection and metalloprotease, *Journal of Dermatology*, **33**: 589-595.
- Mogensen T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses, *Clinical Microbiology Reviews*, **22**: 240-273.

- Moné Y., Gourbal B., Duval D., Du Pasquier L., Kieffer-Jaquinod S., Mitta G., 2010. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4** (9):e813.
- Montagnani C., Avarre J., de Lorgeril J., Quinquand M., Boulo V., Escoubas J., 2007. First evidence of the activation of *Cg-timp*, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway, *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 1-11.
- Montagnani C., Kappler C., Reichhart J.M., Escoubas J.M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusc, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *FEBS Letters*, **561**:75–82.
- Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J-M., 2001. Cg-TIMP, an inductible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with potential role in wound healing and defense mechanisms, *FEBS Letters*, **500**: 64-70.
- Montuori N., Selleri C., Risitano A.M., Raiola A.M., Ragno P., Del Vecchio L., Rotoli B., Rossi G., 1999. Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation, *Clinical Cancer Research*, (6): 1465-1472.
- Moreira R., Balseiro P., Planas J.V., Fuste B., Beltran S., Novoa B., Figueras A., 2012. Transcriptomics of *In Vitro* Immune-Stimulated Hemocytes from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Using High-Throughput Sequencing, *PLoS ONE*, **7**(4):e35009.
- Morris A.J., Malbon C.C., 1999. Physiological regulation of G protein-linked signaling, *Physiological reviews*, **79**: 1373-1430.
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq, *Nature Methods*, **5**: 621–628.
- Moseley P., 1997. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism, *Journal of Applied Physiology*, **83**(5): 1413-1417.
- Moss S.M., Doyle R.W., Lightner D.V., 2005. Breeding shrimp for disease resistance: challenges and opportunities for improvement. In: P.J. Walker, R.G. Lester and M.G. Bondad-Reantaso, Editors, Diseases in Asian aquaculture V. Proceedings of the fifth symposium on diseases in Asian Aquaculture, Asian Fisheries Society, Manila, 379-393.
- Moss S.M., 2002. Marine shrimp farming in the Western Hemisphere: past problems, present solutions, and future visions, *Reviews in Fisheries Science*, **6**: 111-121.
- Mu C., Yu Y., Zhao J., Wang L., Song X., Zhang H., Qiu L., Song L., 2010. An inhibitor κ B homologue from bay scallop *Argopecten irradians*, *Fish & Shellfish Immunology*, **28**: 687-694.
- Multhoff G., 2006. Heat shock proteins and immunity, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **172**: 279-304.
- Muñoz P., Meseguer J., Esteban M.A., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*, *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 12-19.

Mydlarz L., Jones L., Harvell D., 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrate, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systemics*, **37**: 251-288.

- N -

Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., Snyder M., 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing, *Science*, **320**: 1344–1349.

Negm R.S., Pistole T.G., 1999. The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages, *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 658–669.

Newell R.I.E., 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic)-blue mussel. U.S.

Ni D., Song L., Wu L., Chang Y., Yu Y., Qiu L., Wang L., 2007. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819), *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 548-558.

Nilsen I.W., Øverbø K., Sandsdalen E., Sandaker E., Sletten K., Myrnes B., 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity, *FEBS Letters*, **464**: 153-158.

Nokana M., Smith S.L., 2000. Complement system of bony and cartilaginous fish, *Fish & Shellfish Immunology*, **10** (3): 215-228.

Nottage A.S., Birkbeck T.H., 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, **56**(1): 15-19.

Nottage A.S., Birkbeck T.H., 1987. Purification of a proteinase produced by the bivalve-pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339, *Journal of Fish Diseases*, **10**: 211-220.

Novas A., Cao A., Barcia R., Ramos-Martinez J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**: 390-394.

Nowrousian M., 2010. Minireview : Next-Generation Sequencing Techniques for Eukaryotic Microorganisms: Sequencing-Based Solutions to Biological Problems, *Eukaryotic cell*, **9** (9) 1300-1310.

Nowrousian M., Stajich J.E., Chu M., Engh I., Espagne E., Halliday K., Kamerewerd J., Kempken F., Knab B., Kuo H.C., Osiewacz H.D., Pöggeler S., Read N.D., Seiler S., Smith K.M., Zickler D., Kück U., Freitag M., 2010. *De novo* assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis, *PLoS Genetics*, **6**: e1000891.

- O -

- Olafsen J.A., 1996. Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 24. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 49-46.
- Olafsen J.A., 1995. Role of lectins (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria. In: *Advances in Mucosal Immunology*. J. Mestecky et al., (ed.). Plenum Press, New York. Pp. 49-76.
- Olsen Ø.M., Nilsen I.W., Sletten K., Myrnes B., 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **136B**: 107-115.
- Osada M., Matsutani T., Nomura T., 1987. Implication of catecholamines during spawning in bivalves molluscs, *International Journal of Invertebrate Reproduction and development*, **12**: 241-252.
- Ottaviani E., 2006. Molluscan immunorecognition, *Invertebrate Survival Journal*, **3**: 50-63.
- Ottaviani E., Malagoli D., Franchini A., 2003. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Invertebrates Cytokines*. A. Beschin (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ottaviani E., Paemen L.R., Cadet P., Stefano G.B., 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes, *European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, **248**: 319-324.
- Oubella R., Maes P., Allam B., Paillard C., Auffret M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria), *Aquatic Living Resources*, **9** (2): 137-143.
- Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussates* (Mollusca, Bivalvia), *Diseases of Aquatic Organisms*, **15**: 193-197.
- Owens L., Busico-Salcedo N., 2006. *Vibrio harveyi*: pretty problems in paradise. In: *The biology of Vibrios*. Thompson F.L. (ed.) ASM Press, Washington D.C. pp. 266-284.

- P -

- Paillard C., Allam B., Oubella R., 2004. Effect of temperature on defence parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum*, *Disease of Aquatic Organisms*, **59**: 249-262.
- Pallavicini A., Costa M.M., Gestal C., Dreos R., Figueras A., Venier P., Novoa B., 2008. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions, *Developmental and Comparative Immunology*, **32**: 213-226.
- Papo N., Shai Y., 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipids membranes?, *Peptides*, **24**: 1693-1703.

- Parisi M.G., Li H., Jouvett L.B.P., Dyrinda E.A., Parinello N., Cammarata M., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria, *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 834-840.
- Park E-M., Kim Y-O., Nam B-H., Kong H.J., Kim W-J., Lee S-L., Kong I-S., Choi T-J., 2008. Cloning, characterization and expression, analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induce TNF- α factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish & Shellfish Immunology*, **24**: 11-17.
- Pearson Education, 2004. Inc., publishing as Benjamin Cummings.
- Pech L.L., Strand M.R., 1995. Encapsulation of Foreign Targets by Hemocytes of the Moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera, Noctuidae) Involves an Rgd-Dependent Cell-Adhesion Mechanism, *Journal of Insect Physiology*, **41**(6): 481-488.
- Pêches et Océans Canada : <http://www.dfo-mpo.gc.ca/index-fra.htm>
- Pellerin J., Fournier M., Gauthier-Clerc S., Blaise C., Garnerot F., Amiard J-C., Gagné F., 2009. Qu'en est-il de l'état de santé des myes au Saguenay ? Un bilan d'études sur plus d'une décennie. *Revue des Sciences de l'eau, numero thématique*, **22** (2), 271-289.
- Perrigault M., Tanguy A., Allam B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX), *BMC Genomics*, **10**: 377.
- Philipp E.E.R., Kraemer L., Melzner F., Poustka A.J., Thieme S., Findeisen U., Schreiber S., Rosenstiel P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*, *PLoS ONE*, **7**(3):e33091.
- Piano A., Valbonesi P., Fabri E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals, *Cell Stress & Chaperones*, **9**: 134-142.
- Pipe R.K., Farley S.R., Coles J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*, *Cell & Tissue Research*, **289**: 537-545.
- Pipe R.K., 1990a. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*, *Cell and Tissue Research*, **261**: 261-268.
- Pipe R.K., 1990b. Hydrolytic enzymes associated with the granular hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **22**: 595-603.
- Pockley G., 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response, *The Lancet*, **362**: 469-476.
- Pollack J.R., Iyer V.R., 2002. Characterizing the physical genome, *Nature Genetics Supplement*, **32**: 515-521.
- Pollack J.R., Perou C.M., Alizadeh A.A., Eisen M.B., Pergamenschikov A., Williams C.F., Jeffrey S.S., Botstein D., Brown P.O., 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays, *Nature Genetics*, **23**: 41-46.
- Powers J-P., Hancock R., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides*, **24**: 1681-1691.

- Prado-Alvarez M., Gestal C., Novoa B., Figueras A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*, *Fish & Shellfish Immunology*, **26** (1):72-83.
- Prieur G., Mevel G., Nicolas J.L., Plusquellec A., Vigneulle M., 1990. Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment, *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*, **28**: 277-352.
- Pruzzo C., Gallo G., Canesi L., 2005. Minireview: Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components, *Environmental Microbiology*, **7** (6): 761-772.
- Pushkarev D., Neff N. F., Quake S. R., 2009. Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nature Biotechnology*, **27**: 847-850.

- Q -

- Qin J., Huang Z., Chen J., Zou Q., You W., Ke C., 2012. Sequencing and *de novo* Analysis of *Crassostrea angulata* (Fujian Oyster) from 8 Different Developing Phases Using 454 GSFlx, *PLoS ONE*, **7**(8): e43653.
- Qiu L., Song L., Xu W., Ni D., Yu Y., 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, *Fish & Shellfish Immunology*, **22**: 451-466.

- R -

- Reinhardt J. A., Baltrus D.A., Nishimura M.T., Jeck W.R., Jones C.D., Dangl J.L., 2009. De novo assembly using low-coverage short read sequence data from the rice pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Oryzae*, *Genome Research*, **19**:294-305.
- Riccardi C., Nicoletti I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nature Protocols*, **1**(3):1458-1461.
- Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A., 2010. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors, *Developmental and Comparative Immunology*, **34**: 377-386.
- Roberts S., Goetz G., White S., Goetz F., 2009. Analysis of genes isolated from plated haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Marine Biotechnology*, **11**: 24-44.
- Roberts S., Gueguen Y., de Lorgeril J., Goetz F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure, *Developmental and Comparative Immunology*, **32**: 1099-1104.
- Robhom R.A., 1984. *In vitro* phagocytosis by mollusk hemocytes: A survey and critique of methods. In: Comparative Pathobiology Vol. 6 Chang T.C. (ed) Plenum Press, New York. Pp. 147-172.
- Roch P., 1999. Defence mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates, *Aquaculture*, **172**: 125-145.

- Rodrick G.E., 1979. Selected enzyme activities in *Mya arenaria* haemolymph, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **62B**: 313-316.
- Romero A., Dios S., Poisa-Beiro L., Costa M.M., Posada D., Figueras A., Novoa B., 2011. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates, *Developmental and Comparative Immunology*, **35**: 334-344.
- Ronaghi M., Uhlén M., Nyrén P., 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science*, **281**: 363-5.
- Roger E., Grunau C., Pierce R.J., Hirai H., Gourbal B., Galinier R., Emans R., Cesari I.M., Cosseau C., Mitta G., 2008. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*), *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**(11):e330.
- Routsias J., Tzioufas A., 2006. The role of chaperone proteins in autoimmunity, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1088**: 52-64.
- Rowley A.F., Powell A., 2007. Invertebrates Immune Systems-Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?, *The Journal of Immunology*, **179**: 7209-7214.

- S -

- Sa E.C.C., Griffiths N.J., Virji M., 2010. *Neisseria meningitidis* Opc invasin binds to the sulphated tyrosines of activated vitronectin to attach to and invade human brain endothelial cells, *PLoS Pathogens*, **6**(5): e1000911.
- Sadd B.M., Schmid-Hempel P., 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure, *Current Biology*, **16**: 1206-1210.
- Samain J.F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédiers E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J.L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes, *Aquaculture*, **268**: 227-243.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Wu P.C., So M., 1997. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*, *APMIS*, **105**: 875-883.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **74** (12): 5463-5467.
- Sanjuan M.A., Dillon C.P., Tait S.W.G., Moshiah S., Dorsey F., Connell S., Komatsu M., Tanaka K., Cleveland J.L., Withoff S., Green D.R., 2007. Toll like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature*, **450**: 1253-1257.

- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray, *Science*, **5235**: 467-470.
- Schneeweiss H., Renwanz L., 1993. Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin, *Developmental and Comparative Immunology*, **17**: 377-387.
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1, *The EMBO Journal*, **10**: 2247-2258.
- Seo J-K., Crawford J., Stone K., Noga E., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**: 1998-2004.
- Shannon M.F., Rao S., 2002. Transcription. Of chips and ChIPs, *Science*, **296** (5568): 666-669.
- Siebert S., Robinson M.D., Tintori S.C., Goetz F., Helm R.R., Smith S.A., Shaner N., Haddock S.H.D., Dunn C.W., 2011. Differential Gene Expression in the Siphonophore *Nanomia bijuga* (Cnidaria) Assessed with Multiple Next-Generation Sequencing Workflows, *PLoS ONE*, **6** (7): e22953.
- Smith V.J., Söderhäll K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates, *Developmental and comparative Immunology*, **15**: 251-261.
- Sobecky P.A., Mincer T.J., Chang Y., Toukdarian A., Helinski D.R., 1998. Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 2822-2830.
- Sokolova I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense, *Invertebrate Survival Journal*, **6**: 49-58.
- Song L., Wu L., Ni D., Chang Y., Xu W., Xing K., 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamark 1819), responding to bacteria challenge and naphthalin stress, *Fish & Shellfish Immunology*, **21**: 335-345.
- Song X., Zhang H., Zhao J., Wang L., Qiu L., Mu C., Liu X., Qiu L., Song L., 2010. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopecten irradians*, *Fish & Shellfish Immunology*, **28**: 326-332.
- Sottrup-Jensen L., 1989. α -macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 11539-11542.
- Soulas C., Baussant T., Aubry J.P., Delneste Y., Barrilat N., Caron G., Renno T., Bonnefoy J.Y., Jeannin P., 2000. Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages, *The Journal of Immunology*, **165**: 2335-2340.
- Splettstoesser W.D., Schuff-Werner P., 2002. Oxidative stress in phagocytes – “The enemy within”, *Microscopic Research and Technique*, **57**: 441-455.
- Strausberg R., Levy S., Ya-Hui R., 2008. Review: Emerging DNA sequencing technologies for human genomic medicine, *Drug Discovery Today*, **13** (13/14): 569-577.
- Su J., Ni D., Song L., Zhao J., Qiu L., 2007. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein (CfPGRPS1) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 646-656.

- Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae, *Diseases of Aquatic Organisms*, **33**: 111-118.
- Sukhotin A.A., Kulakowski, E.E., 1992. Growth and population dynamics in mussels (*Mytilus edulis* L.) cultured in the White Sea, *Aquaculture*, **101**: 59-73.
- Suresh K., Mohanda A., 1990. Number and types of hemocytes in *Sunetta scripta* and *Vollorita cyprinoides* var. *cochinensis* (Bivalvia) and leukocytosis subsequent to bacterial challenge, *Journal of Invertebrate Pathology*, **55**: 312-318.
- Synard S.L., 2008. Morphological classification of soft-shell clam, *Mya arenaria*, hemocytes: phenotypic description of hemic neoplasia. MSc dissertation. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edouard Island, Charlottetown, PE, Canada.

- T -

- Tafalla C., Gómez-León J., Novoa B., Figueras A., 2003. Nitric oxide production by carpet Shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes, *Developmental and Comparative Immunology*, **27**: 197-205.
- Tafalla C., Novoa B., Figueras A., 2002. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132B**: 423-431.
- Takeuchi O., Akira S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation, *Cell*, **140**: 805-820.
- Takeda K., Akira S., 2004. TLR signaling pathways, *Seminars in Immunology*, **16**: 3-9.
- Tanguy A., Guo X., Ford S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters, *Gene*, **338**: 121-131.
- Tanguy A., Bierne N., Saavedra C., Pina B., Bachère E., Kube M., Bazin E., Bonhomme F., Boudry P., Boulo V., Boutet I., Cancela L., Dossat C., Favrel P., Huvet A., Jarque S., Jollivet D., Klages S., Lapègue S., Leite R., Moal J., Moraga D., Reinhardt R., Samain J-F., Zouros E., Canario A., 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution, *Gene*, **408**: 27-36.
- Taris N., Lang R.P., Reno P.W., Camara M.D., 2009. Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display, *Animal Genetics*, **40**: 663-677.
- Tasumi S., Vasta G.R., 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*, *The Journal of Immunology*, **179**(5):3086-98.

- Terahara K., Takahashi K.G., Nakamura A., Osada M., Yoda M., Hiroi T., Hirasawa M., Mori K., 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental and Comparative Immunology*, **30**(8): 667-83.
- Thompson J.R., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D.L., Polz M.F., 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population, *Science*, **307**(5713):1311-3.
- Thomson R., Macpherson H.L., Riaz A., Birkbeck T.H., 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot *Scophthalmus maximus* (L.), *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 243-250.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J., 2004. Biodiversity of vibrios, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**: 403-431.
- Tincu J., Taylor S., 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 3645-3654.
- Tomaru Y., Kawabata Z., Nakano S., 2001. Mass mortality of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* in relation to water temperature, chlorophyll a and phytoplankton composition, *Diseases of Aquatic Organisms*, **44** (1): 61-68.
- TomTang Y., Hu T., Arterburn M., Boyle B., Bright J.M., Palencia S., Emtage P.C., Funk W.D., 2005. The complete complement of C1q-domain-containing proteins in *Homo sapiens*, *Genomics*, **86** (1):100-111.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins 319, 209-218. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*, **319** (3), 209-218.
- Travers M-A., Le Bouffant R., Friedman C.S., Buzin F., Cougard B., Huchette S., Koken M., Paillard C., 2009. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response, *Journal of Cellular Biochemistry*, **106**: 152-160.
- Travers M.A., Da Silva P.M., Goic N.L., Marie D., Donval A., Huchette S., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocytes, *Fish and Shellfish Immunology*, **24**: 400-411.
- Tsai M.F., Kou G.H., Liu H.C., Chang C.F., Peng S.E., 1999. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks, *Disease of Aquatic Organisms*, **38**: 107-114.
- Tsan M-F., Gao B., 2004. Heat shock protein and innate immunity, *Cellular and Molecular Immunology*, **1**: 274-279.

- U -

- Urakawa H., Kita-Tsukamoto L., Ohwada K., 1999. 16S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis of psychrotrophic vibrios from Japanese coastal water, *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 1001-1007.

- V -

- Vallabhapurapu S., Karin M., 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system, *Annual Review of Immunology*, **27**: 693-733.
- Vandenbergh J., Thompson F.L., Gomez-Gil B., Swings J., 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems, *Aquaculture*, **219**: 9-20.
- Vásquez J.A., Docasal S.F., Mirón J., Gonzáles M.P., Murado M.A., 2006. Proteases production by two *Vibrio* species on residuals marine media, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **33**: 661-668.
- Vasta G.R., Marchalonis J.J., 1987. Invertebrates agglutinins and the evolution of humoral and cellular recognition factors. In: *Invertebrates Models. Cell Receptors and Cell Communication*. (Greenberg A.H.) S. Karger, Basel. Pp. 104-117.
- Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W., 1995. Serial analysis of gene expression, *Science*, **5235**: 484-487.
- Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante F., Lanfranchi G., Novoa B., Roch P., Figueras A., Pallavicini A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, *BMC Genomics*, **12**: 69.
- Venier P., De Pittà C., Bernante F., Varotto L., De Nardi B., Bovo G., Roch P., Novoa B., Figueras A., Pallavicini A., Lanfranchi G., 2009. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences, *BMC genomics*, **10**: 72.
- Venier P., Pallavicini A., De Nardi B., Lanfranchi G., 2003. Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*, *Gene*, **314**: 29-40.
- Villamil L., Gómez-León J., Gómez-Chiarri M., 2007. Role of nitric oxide in the defense of *Crassostrea gigas* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*, *Developmental and Comparative Immunology*, **31**: 968-977.
- Virji M., Makepeace K., Moxon E.R., 1994. Distinct mechanisms of interactions of *Opc* expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; The role of integrins in apical interactions, *Molecular Microbiology*, **14**(1):173-184.

- W -

- Wade T. L., Sericano J. L., Gardinali P.R., Wolff G., Chambers L., 1998. NOAA's 'Mussel Watch' Project: Current use Organic Compounds in Bivalves, *Marine Pollution Bulletin*, **37** (1-2): 20-26.
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J-L., Marissal E., Berthe F., 2002. Characterization of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria, *Compte rendus Biologies*, **325**: 231-238.
- Wallin R., Lundqvist A., Moré S., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H-G., 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system, *Trends in Immunology*, **23**: 130-135.

- Wang B., Zhao J., Song L., Zhang H., Wang L., Li C., Zheng P., Zhu L., Qiu L., Xing L., 2008. Molecular cloning and expression of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, and the inhibitory activity of its recombinant domain, *Fish & Shellfish Immunology*, **24**: 629-637.
- Wang H., Song L., Li C., Zhao J., Zhang H., Ni D., 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhigong scallop *Chlamys farreri*, *Molecular Immunology*, **44**: 722-731.
- Wang L., Song L., Zhao J., Qiu L., Zhang H., Xu W., Li H., Li C., Wu L., Guo X., 2009. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Discovery and annotation of host-defense genes, *Fish & Shellfish Immunology*, **26**: 744-750.
- Wang X., Rocheleau T.A., Fuchs J.F., Hillyer J.F., Chen C., Christensen B.M., 2004. A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria, *Insect Molecular Biology*, **13**: 273-282.
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nature Reviews Genetics*, **10** (1): 57-63.
- Wei X., Yang J., Yang D., Xu J., Liu X., Yang J., Fang J., Qiao H., 2012. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*, *Fish & Shellfish Immunology*, **32**: 178-185.
- Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic acid research*, **18** (24): 7213-7218.
- Wheeler D. A., Srinivasan M., Egholm M., Shen Y., Chen L., McGuire A., He W., Chen Y.-J., Makhijani V., Roth G. T., Gomes X., Tartaro K., Niazi F., Turcotte C. L., Irzyk G. P., Lupski J. R., Chinault C., Song X.-Z., Liu Y., Yuan Y., Nazareth L., Qin X., Muzny D. M., Margulies M., Weinstock G. M., Gibbs R. A., Rothberg J.M., 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing, *Nature*, **452**: 872-876.
- Wilhelm B.T., Marguerat S., Watt S., Schubert F., Wood V., Goodhead I., Penkett C.J., Rogers J., Bähler J., 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution, *Nature*, **453**: 1239-1243.
- Wittwer D., Wiesner A., 1996. Peptide RGDS inhibits the fibronectin-enhanced phagocytosis of yeast cells by *Galleria mellonella* hemocytes *in vitro*, *Journal of Invertebrate Pathology*, **68**(2):199-200.

- X -

- Xing J., Jiang J., Zhan W., 2012. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated *in vitro*, *Fish & Shellfish Immunology*, **32**: 89-93.
- Xing J., Zhan W-B., Zhou L., 2002. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop (*Chlamys farreri*), *Fish & Shellfish Immunology*, **13**: 271-278.

- Xu W., Faisal M., 2009. Development of a cDNA microarray of Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) foot and its use in understanding the early stage of underwater adhesion, *Gene*, **436**: 71-80.
- Xue Q-G., Schey K.L., Volety A., Chu F-L., La Peyre J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **139B**: 11-25.
- Xue Q-G., Itoh N., Schey K.L., Li Y-L., Cooper R.K., La Peyre J.F., 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptative evolution of *i*-type lysozymes, *Cellular and Molecular Life Science*, **64**: 82-95.

- Y -

- Yamaura K., Takahashi K.G., Suzuki T., 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **149**: 168-175.
- Yang J., Wang L., Zhang H., Qiu L., Wang H., Song L., 2011. C-Type Lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) Mediating Immune Recognition and Opsonization, *PLoS ONE*, **6** (2): e17089.
- You Y., Huan P., Wang X., Liu B., 2012. The potential roles of a laminin receptor in adhesion and apoptosis of cells of the marine bivalve *Meretrix meretrix*, *PLoS One*, **7**(10):e47104.
- Yu Y., Qiu L., Song L., Zhao J., Ni D., Zhang Y., Xu. 2007. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, *Fish & Shellfish Immunology*, **23**: 419-429.
- Yu Z., He X., Fu D., Zhang Y., 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*, *Fish & Shellfish Immunology*, **31**: 533-539.

- Z -

- Zhang D.C., Hu Y.T., Guo H.Y., Cui S.G., Su T.F., Jiang S.G., 2011. cDNA cloning and mRNA expression of a tandem-repeat galectin (PoGal2) from the pearl oyster, *Pinctada fucata*, *Genetics and Molecular Research*, **10**(3): 1963-1974.
- Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xiong Z., Que H., Xie Y., Holland P.W.H., Paps J., Zhu Y., Wu F., Chen Y., Wang J., Peng C., Meng J., Yang L., Liu J., Wen B., Zhang N., Huang Z., Zhu Q., Feng Y., Mount A., Hedgecock D., Xu Z., Liu Y., Domazet-Loso T., Du Y., Sun X., Zhang S., Liu B., Cheng P., Jiang X., Li J., Fan D., Wang W., Fu W., Wang T., Wang B., et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation, *Nature*, **490**: 49-54.

- Zhang H., Wang L., Song L., Song X., Wang B., Mu C., Zhang Y., 2009. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor, *Fish & Shellfish Immunology*, **26**: 56-64.
- Zhang H., Song L., Li C., Zhao J., Wang H., Qiu L., Ni D., Zhang Y., 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity, *Fish & Shellfish Immunology*, **25**: 281-289
- Zhang L., Li L., Zhang G., 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates, *Fish & Shellfish Immunology*, **30**: 653-660.
- Zhang L., Li L., Zhang G., 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system, *Developmental and Comparative Immunology*, **35**: 603-610.
- Zhang S.M., Zeng Y., Loker E.S., 2008. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*, *Innate Immunity*, **14**: 175-189.
- Zhang W., Wu X., Wang M., 2006. Morphological, structural, and functional characterization of the hemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*, *Aquaculture*, **251**: 19-32.
- Zhang X.H., Austin B., 2005. Haemolysins in *Vibrio* species, *Journal of Applied Microbiology*, **98**: 1011-1019.
- Zhao J., Song L., Li C., Ni D., Wu L., Zhu L., Wang H., Xu W., 2007. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein, *Molecular Immunology*, **44**: 360-368.
- Zhu L., Song L., Chang Y., Xu W., Wu L., 2006. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck, 1829), *Fish & Shellfish Immunology*, **20**: 320-331.
- Zügel U., Kaufmann S., 1999. Role of heat shock protein in protection from pathogenesis of infectious diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, **12**(1): 19-39.